

Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre
der
Forschungszentrum Jülich GmbH

Untersuchungen zur Charakterisierung der Aufnahme, des Transports und der
Reduktion von Nitrat in Blättern und Wurzeln von *Brassica napus* L. und
Lupinus albus L. unter Einsatz der kurzlebigen Radioisotope ^{11}C und ^{13}N .

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Grades
Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)
der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am 25.09.2007

von
Dipl.Biol. Caspar-Friedrich Hahn
aus Telgte

Referent: Prof. Dr. F. Führ
Korreferent: Prof. Dr. A. Goldbach
Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr : 2009

Kurzfassung

Die Aufnahme, der Transport und die Reduktion von NO_3^- zu NH_4^+ stellen einen wichtigen Prozess im Stoffwechsel der Pflanze dar, der vielen Wechselwirkungen unterliegt. Seit mehr als 30 Jahren wird ein Modell diskutiert, nach dem K^+ eine wichtige Rolle beim Transport von NO_3^- in den Spross spielt. Um dieses Modell zu bewerten, wurden in dieser Arbeit 2 Spezies gewählt, von denen eine NO_3^- bevorzugt in der Wurzel (*Lupinus albus* L. Sorte Amiga), die andere NO_3^- überwiegend in den Blättern reduziert (*Brassica napus* L. Sorte Liberator-00).

Unter Einsatz des kurzlebigen ^{13}N wurden Aufnahmekinetiken von NO_3^- an Raps und Lupine erstellt, wobei zwischen Influx, Efflux und Netto-Aufnahme unterschieden wurde. Nach NH_4^+ -Ernährung reagieren beide Spezies beim ersten Kontakt mit NO_3^- mit einem Anstieg der Aufnahmerate, wobei ein Efflux von NO_3^- erst nach einigen Stunden einsetzt. Weiterhin wurde festgestellt, dass zur Induktion der NO_3^- -Aufnahme bereits ein kurzfristiger NO_3^- -Puls ausreicht. Die Aufnahmekinetiken der beiden Spezies zeigen bei niedrigem NO_3^- -Angebot das Bild eines induzierbaren High Affinity Transport System (HATS), während bei hohem Angebot ein Low Affinity Transport System (LATS) aktiv ist. Die Aufnahmerate von Raps liegt dabei deutlich über den Aufnahmeraten von häufig untersuchten Spezies wie Gerste oder Weizen, während die Lupine eine deutlich niedrigere Aufnahmerate aufweist.

Werden NO_3^- -ernährte Pflanzen unter K^+ -Mangel angezogen, so sind NO_3^- -Influx und NO_3^- -Efflux reduziert. Wird den K-Mangelpflanzen wieder K^+ angeboten, so steigt der Influx stärker als der Efflux und es kommt zu einer höheren Nettoaufnahme. Der Efflux nimmt erst zeitlich verzögert zu, so dass sich hier ein ähnliches Bild wie bei der Induktion der NO_3^- -Aufnahme bei NH_4^+ -ernährten Pflanzen ergibt.

Im Xylem-Exudat der Lupine ist bei einem NO_3^- -Angebot unter 250 μM kein NO_3^- nachweisbar. In den Blättern ist die Nitratreduktaseaktivität (NRA) erst bei einer Ernährung von über 1 mM NO_3^- festzustellen. Bei Raps lässt sich NO_3^- im Xylem selbst bei einem Angebot von weniger als 100 μM nachweisen und die NRA ist in allen Pflanzenteilen nachweisbar. Unter K^+ -Mangel ist die NRA in beiden Spezies reduziert.

Der Einsatz radioaktiver C-Isotope (^{11}C bzw. ^{14}C) lieferte widersprüchliche Daten. Bei einem Pulsexperiment zeigte die -K-Variante eine stärkere Verlagerung von Assimilaten in die Wurzel als die +K-Variante. Bei einer kontinuierlichen Applikation lag der Transfer von Assimilaten jedoch deutlich niedriger als bei der +K-Variante oder einer Variante, die während des Versuchs auf Medium mit K^+ umgestellt wurde.

Werden Raps und Lupine mit 150 μM NO_3^- angezogen, so ist unter K^+ -Mangel der Malatgehalt deutlich reduziert. Wird der K^+ -Mangel aufgehoben, so erfolgt ein starker Anstieg der Malatgehalte. Nach einem Tag liegen die Werte deutlich über den Malatgehalten der + K^+ -Variante, sie gehen aber in den folgenden Tagen langsam auf das Niveau der + K^+ -Variante zurück. Die Induktion eines K^+ - Mangels führt zu einem langsamen Absinken der Malatgehalte in Raps oder Lupine.

Wenn auch nicht unumstritten, so kann als Fazit der hier vorgestellten Untersuchungen das von Ben Zioni et al. (1971) vorgestellte Modell eines K^+ -Shuttles zwischen Xylem und Phloem zur Erklärung vieler der beschriebenen Effekte beitragen.

Abstract

Uptake, transport and reduction of nitrate to ammonia are part of an important process in plant metabolism which is subject to many interactions. For more than 30 years a model has been discussed where potassium plays an important role in nitrate transport to the shoot. To evaluate this model 2 plant species have been selected in this study, where one is reducing nitrate predominantly in the root (*Lupinus albus* L. species Amiga) while the other reduces nitrate predominantly in the shoot (*Brassica napus* L. species Liberator-00).

Usage of the short-lived radioisotope ^{13}N permitted to generate nitrate-uptake kinetics of oilseed rape and white lupin with distinction between influx, efflux and net uptake. Upon first contact with nitrate following ammonium-nutrition both species show an increasing uptake rate of nitrate. Initially nitrate efflux is missing but it starts after several hours. Further on it was stated that a short term pulse of nitrate is sufficient for induction of nitrate-uptake.

Uptake kinetics of both species at low nitrate supply show the picture of an inducible high affinity transport system (HATS) while as a reaction to a higher supply a low affinity transport system (LATS) is active. The nitrate uptake rate of oilseed rape is much higher than the one of commonly studied species like wheat or barley, while the nitrate uptake rate of white lupin is much lower.

Plants grown under K^+ -deficiency show lower nitrate-influx and lower efflux. As soon as K^+ is applied nitrate-influx increases stronger than efflux, leading to a higher net uptake of nitrate. Nitrate efflux increases after a lag period, showing a similar reaction like the induction of nitrate-uptake after previous ammonium-nutrition.

At nitrate nutrition below 250 μM no nitrate can be detected in xyleme exudates of white lupin. Nitrate reductase activity (NRA) in the shoot starts at nutrition levels of 1 mM nitrate. In oilseed rape nitrate can be detected in the xyleme even at nutrition below 100 μM nitrate and NRA is measurable in all plant parts. Under K^+ deficiency the NRA in both species is reduced.

Using radiolabelled carbon-isotopes (^{11}C , ^{14}C) showed contradictory data. In a pulse experiment the K^+ -deficient plants of *Brassica napus* L. showed higher export of assimilates to the roots than the K^+ -supplied control. At continuous application the transfer of assimilates to the root was much less in the $-\text{K}^+$ -plants compared to $+\text{K}^+$ plants or plants that have been switched from $-\text{K}$ to $+\text{K}$ medium during the experiment.

Oilseed rape and white lupin, grown with 150 μM nitrate, showed reduced malate content under K^+ -deficiency. As soon as K^+ is resupplied a strong increase of malate can be determined. One day after supply with K^+ malate reaches a level above the one of continuously K^+ -supplied plants, but during the next days the concentration declines. Induction of K^+ -deficiency slowly leads to a reduction of malate contents in oilseed rape and white lupin.

Also not undisputed, the model of a K^+ -shuttle between xyleme and phloeme presented by Ben Zioni et al. (1971) can contribute to the explanation of the described effects.

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	7
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Abkürzungen	17
3.2	Versuchspflanzen und Kulturbedingungen	17
3.2.1	Versuchspflanzen	17
3.2.2	Anzuchtbedingungen	17
3.2.3	Kulturbedingungen.....	18
3.2.4	Wachstumsraten	19
3.3	Nitrataufnahme.....	20
3.4	Nitratreduktaseaktivität (NRA)	21
3.4.1	In vivo Nitratreduktasetest	21
3.4.2	In vitro Nitratreduktasetest	23
3.5	Nitratextraktion	24
3.6	Produktion und Einsatz des kurzlebigen ^{13}N.....	26
3.6.1	Aufbereitung des $^{13}\text{NO}_3^-$	28
3.6.2	Anwendung von $^{13}\text{NO}_3^-$ bei der Nitrataufnahme.....	29
3.7	$^{11}\text{CO}_2$ und $^{14}\text{CO}_2$ bei Untersuchungen zum Assimilattransport.....	31
3.7.1	Produktion des kurzlebigen $^{11}\text{CO}_2$	31
3.7.2	Kontinuierliche $^{11}\text{CO}_2$ Applikation.....	32
3.7.3	$^{14}\text{CO}_2$ Applikation und ^{14}C -Messung	34
3.7.4	Photorespiration, Dunkelrespiration und Wurzelatmung	35
3.8	Gewinnung und Analyse von Xylemsaft	36
3.8.1	Nachweis von Anionen im Xylemsaft	37
3.8.2	Nachweis der Kationen im Xylemsaft.....	38
3.9	AAS - Analytik	38
3.10	Aufnahme von Kalium und Influx von ^{86}Rb	39
3.11	Malatbestimmung.....	39
4	Ergebnisse	42
4.1	Wachstumskurven	42
4.1.1	Frischmassezunahme von Brassica napus cv. Liberator-00	42
4.1.2	Frischmassenzunahme von Lupinus albus cv. AMIGA	45

4.2	Nitratreduktase von Raps und Lupine	47
4.2.1	<i>In vitro</i> Nitratreduktaseaktivität (NRA)	47
4.2.2	<i>In vivo</i> Nitratreduktase von <i>Brassica napus</i> L.....	50
4.2.2.1	Einfluss des Nitratangebots auf die Nitratreduktion	50
4.2.2.2	Induktion der NRA bei NH_4^+ - ernährten Pflanzen	51
4.2.2.3	Circadiane Rhythmik der Nitratreduktase und Einfluss von K^+ auf den <i>in-vivo</i> Nitratreduktasetest	54
4.2.3	<i>In vivo</i> Nitratreduktase von <i>Lupinus albus</i> L. bei kontinuierlicher Versorgung mit K^+ und unter K-Mangel	59
4.2.3.1	Einfluss von K^+ und Na^+ im Testmedium des NRA-Tests auf die Bestimmung der NRA von <i>Lupinus albus</i> L.	61
4.3	Stickstoff - Stoffwechsel	62
4.3.1	Nitrataufnahmekinetiken von Raps (^{13}N -Influx) bei geringem N-Angebot	62
4.3.2	Nitrataufnahmekinetiken von Raps (^{13}N -Influx) bei hohem N-Angebot....	68
4.3.3	Nitrataufnahmekinetiken von Lupinen (^{13}N -Influx)	72
4.3.4	Nitrataufnahmekinetiken von Lupinen (^{13}N -Influx) bei hohem NO_3^- -Angebot	73
4.3.5	Transport von ^{13}N in Pflanzen.....	75
4.3.6	Induktion der Nitrataufnahme nach vorangegangener Anzucht mit NH_4^+	75
4.3.7	Auswirkungen von Kalium auf die Nitrataufnahme	80
4.3.8	Einfluss der Ernährungsbedingungen auf den Nitratgehalt und ausgewählte Kationen in unterschiedlichen Pflanzenorganen von <i>Brassica napus</i> L.....	81
4.4	Kaliumaufnahme.....	84
4.4.1	Kaliumaufnahme und OH^- -Abgabe von Rapspflanzen.....	85
4.4.2	Verlagerung von K^+ in Rapspflanzen	86
4.5	Untersuchungen des Xylemsaftes	89
4.5.1	Einfluss von N- und K-Angebot auf den Xylemsaft von <i>Brassica napus</i> L.	89
4.5.2	Einfluss von N- und K-Angebot auf den Xylemsaft von <i>Lupinus albus</i> L.	93
4.6	Wechselwirkungen zwischen Nitrataufnahme, Kaliumangebot und der Verlagerung von Assimilaten	96
4.6.1	Einfluss des Nitrat-Angebots auf die CO_2 -Fixierung und CO_2 -Verlagerung	96
4.6.2	Verlagerung von ^{11}C bei <i>Brassica napus</i> L.	99

4.7	Bestimmung von L-Malat	103
4.7.1	Extraktionsbedingungen für Raps	103
4.7.2	Nitrat-Angebot und L-Malatgehalt von Raps	104
4.7.3	Kalium-Angebot und L-Malatgehalt von Raps.....	108
4.7.4	Einfluss von K^+ auf den Gehalt von L-Malat im Gewebe von Lupinen ...	111
5	Diskussion	113
5.1	K^+-Angebot und Wurzel / Spross - Verhältnis	114
5.2	Kaliumaufnahme	114
5.3	Stickstoff-Aufnahme	116
5.4	Nitratreduktaseaktivität und K^+	124
5.5	Verlagerung von Assimilaten und Malat-Analytik	127
6	Zusammenfassung.....	132
7	Summary	134
8	Literaturverzeichnis	136
9	Abbildungsverzeichnis	143
10	Tabellenverzeichnis	148

1 Einleitung

Stickstoff stellt mit 78 % das häufigste Gas der Erdatmosphäre dar, jedoch sind nur wenige stickstoffoxidierende Bakterien in der Lage, dieses Element für den Stoffwechsel nutzbar zu machen. Die Mehrheit der Organismen ist darauf angewiesen, ihren Bedarf an Stickstoff durch reduzierte oder oxidierte Verbindungen dieses Elements zu decken. Seit **Justus von Liebig** um 1840 erkannte, dass Pflanzen ihre Nährstoffe in anorganischer Form aufnehmen und in organische Verbindungen umwandeln, bestand ein reges Interesse daran, diese Vorgänge besser zu verstehen. Seine Erkenntnisse führten zum Einsatz mineralischer Dünger in der Landwirtschaft, die zu diesem Zeitpunkt dringend nach Möglichkeiten suchte, den Ackerpflanzen eine bessere Ernährung zukommen zu lassen, um höhere und gesicherte Erträge zu erzielen. **Albert Schultz** (1895), der sich intensiv mit der Lehre Liebig's befasste, zeigte in langjährigen Versuchen auf seinem Gut Lupitz (1855-1894), dass die Aufnahme von Leguminosen in die Dreifelderwirtschaft zu Ertragsteigerungen führt. Dies allein reichte aber nicht aus, die von **Malthus** (1789) aufgestellte Theorie zu entkräften, dass die Welt einer großen Hungerkatastrophe entgegen gehe, da die landwirtschaftliche Produktion sich nur linear steigern ließe, sich die Bevölkerungszahl jedoch exponentiell entwickle. Erst mit der chemischen Synthese von stickstoffhaltigen Düngemitteln, die nach der ersten künstlichen Harnstoffherstellung durch **Friedrich Wöhler** (1828) in der Entwicklung des Haber-Bosch-Verfahrens (1909) ihren Höhepunkt fand, war der Weg für eine weitere Ertragsteigerung frei.

Während die Landwirtschaft vorrangig an der Steigerung und Sicherung der Erträge interessiert war, stand zur gleichen Zeit auf Seiten der Pflanzenernährung das Verständnis über das Zusammenwirken von Nährstoffen im Mittelpunkt der Forschung. Das vorrangige Ziel war es daher, mit gezielten Mangelversuchen herauszufinden, welche Nährelemente die Pflanze benötigt und in welchem Umfang sie ihr angeboten werden müssen. Dies führte zur Klassifikation der Nährstoffe in Makronährelemente (C, O, H, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe) und Mikronährelemente (Spurenelemente), wobei von den letztgenannten lange Zeit nicht bekannt war, warum sie von der Pflanze benötigt werden.

Im Laufe der Zeit gewann daher die Pflanzenphysiologie, die sich mit den Zusammenhängen des Stoffwechsels befasst, immer mehr an Bedeutung.

De Saussure erkannte bereits 1804, dass Stickstoff ein essentielles Element für die Pflanze darstellt. Nach anfänglichen Untersuchungen der Zusammensetzung der pflanzlichen Biomasse gelang es durch die Analyse von Pflanzensaftproben, erste Hinweise auf Stoffströme in der Pflanze zu gewinnen. Mit verbesserten Nachweistechiken wurde eine immer größere Zahl von Stoffen im pflanzlichen Gewebe identifiziert, und die ersten Modelle für Stoffwechselkreisläufe entstanden (**Sprengel**, 1832). Die Photosynthese und die mit ihr gekoppelten Prozesse spielten hierbei eine wesentliche Rolle. Aber auch der katabole Kohlenstoff-Stoffwechsel wurde untersucht, und 1882 konnte **Julius von Sachs** zeigen, dass bei der Respiration die Substanzen wieder verbraucht werden, die in der Lichtreaktion aus CO_2 aufgebaut worden waren.

Die Untersuchungen zum Stickstoffstoffwechsel wurden erst später vorangetrieben, und so dauerte es auch lange, bis die Synthese von Aminosäuren, der Aufbau von Proteinen und N-haltigen Kohlenstoffverbindungen (z.B. Purine, Pyrimidine) aufgeklärt wurde. Die chemische Struktur von Enzymen, die alle Stoffwechselprozesse katalysieren, wurde erst im 20. Jahrhundert aufgedeckt. Seit **Buchner** (1897) nach der Gewinnung eines zellfreien Extrakts aus Hefezellen feststellte, dass diese Lösung in der Lage war, Saccharose in Alkohol zu überführen, waren neue Wege für die Enzymologie geebnet. Die Charakterisierung der Enzyme als Protein erfolgte allerdings erst durch **Sumner** (1929).

Auch morphologische Untersuchungen haben einen Beitrag zur Aufklärung der Stoffflüsse leisten können. Die Beschreibung der stoffleitenden und stoffspeichernden Gewebe mit Hilfe der Lichtmikroskopie führte zu unterschiedlichen Theorien über die Transportvorgänge in der Pflanze. Mit dem Einsatz der Elektronenmikroskopie auf dem Gebiet der Zellbiologie gelang es später, auch auf zellulärer Ebene, Strukturen sichtbar zu machen und ihre Funktion zu erklären. Einen anderen Weg zum Verständnis der Vorgänge in der Zelle bot der Einsatz von Mikropipetten (z.B. patch-clamp Technik). Die elektrophysiologischen Reaktionen einer Zelle, wie das Öffnen und Schließen eines Ionen-spezifischen Kanals, konnten so betrachtet werden.

Mit der Erkenntnis, dass die katalytische Aktivität eines zentralen Enzyms der Photosynthese (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase) an den Nitrat-Status in den Blättern gekoppelt ist (**Weissbach** et al. , 1956), rückten C- und N-Stoffwechsel in der Physiologie enger zusammen. Obwohl Blatt und Wurzel mit der Aufnahme und Reduktion von CO_2 auf der einen Seite und der Aufnahme von Wasser und Nährstoffen auf der anderen Seite unterschiedliche Aufgaben übernommen haben, lag nun das Zusammenspiel dieser Organe im Mittelpunkt des Interesses. Aufgabe der Photosynthese ist es, einerseits Bausteine für den Aufbau des Kohlenstoffskeletts der Pflanze zu liefern, andererseits aber auch energiehaltige Speicherstoffe, wie z.B. Stärke aufzubauen. Ein Teil der in der Photosynthese gebildeten C-Verbindungen wird jedoch zur Synthese von Aminosäuren abgezweigt, aus denen später Enzyme und auch die Proteine des Lichtsammel-Komplexes aufgebaut werden. Weiterhin werden Zwischenprodukte der Photosynthesereaktion über die Leitungsbahnen des Phloems zu den Wurzeln geleitet, wo sie wieder abgebaut werden. Dies mag zunächst paradox klingen, doch durch das beim Abbau freigesetzte ATP ist die Versorgung der Wurzel mit Energieäquivalenten gewährleistet. Als eine Substanz, die zu diesem Zweck in die Wurzeln transportiert wird, sei beispielsweise die Äpfelsäure genannt.

Mit den Methoden der Molekularbiologie wurden seither zahlreiche Enzyme des N- und C-Stoffwechsels identifiziert. Die Charakterisierung dieser Proteine erfolgte zuerst nur über die umgesetzten Substrate. Später wurden membrangebundene und im Cytosol gelöste Varianten desselben Enzyms unterschieden. Es wurden Kinetiken über die Umsetzung der Substrate und der Einfluss von Cosubstraten und Inhibitoren auf die Enzymaktivitäten untersucht. Mit der Entdeckung von Carriern und Tunnelproteinen kamen dann Theorien über den Mechanismus der Nährstoffaufnahme auf. All dies diente dazu, mehr über die Regulierung der Aktivität von Enzymen oder Membranproteinen zu erfahren.

Für Untersuchungen zur Umsetzung und zum Transport von CO_2 oder NO_3^- durch die Pflanze fehlte es lange Zeit an geeigneten Methoden, diese Vorgänge gründlich zu verfolgen. Zwar konnte die Nitrataufnahme aus der Abnahme der NO_3^- -Konzentration in einer Nährlösung errechnet werden, doch Transportgeschwindigkeit und Umsetzung in der Pflanze blieben dem Experimentator verborgen. Ähnliches galt für die CO_2 -

Aufnahme und den Assimilattransport. Einen großen Fortschritt in diesem Punkt brachte der Einsatz von Radioisotopen. Die Aufnahme von CO_2 und die Identifikation der verschiedenen Zwischenprodukte der Photosynthese konnten erstmals durch den Einsatz des ^{14}C -Isotops aufgeklärt werden. Eine quantitative Bestimmung dieses langlebigen β - Strahlers ($T_{1/2} = 5760$ Jahre) setzt jedoch immer eine Zerstörung der Versuchspflanze voraus. Nach der Ernte muss die Pflanze in der Regel extrahiert oder verascht werden, um dann eine Messung im Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer durchführen zu können. Von Vorteil ist beim Einsatz von ^{14}C , dass nach einer kurzen Markierungszeit (z.B. ein Puls von wenigen Minuten) die Verlagerung über einen langen Zeitraum verfolgt werden kann. Mittels einer Zeitreihe sind so Aussagen zur Transportgeschwindigkeit und zu den Zielorten der Verlagerung möglich. Analog dem ^{14}C bietet sich für langfristige Untersuchungen zum Nitratstoffwechsel das stabile Isotop ^{15}N an. Da ^{15}N als natürlich vorkommendes stabiles Isotop keine Strahlung emittiert, ist der Nachweis des Stickstoffs erst nach der Aufbereitung der Proben mit Hilfe eines Massenspektrometers möglich.

Für Kurzzeitstudien, bei denen etwa eine schnell eintretende Änderung der Aufnahmeparameter aufgezeigt werden soll, wird jedoch eine Methode benötigt, die über den gesamten Zeitraum des Versuches und nicht nur zum Ende des Versuchs Daten liefert. Hier bieten sich als Isotope γ - Strahler an, deren Strahlung das Gewebe der Versuchspflanze oder die Nährlösung durchdringt und mit entsprechenden Detektoren gemessen werden kann. Die Radioisotope ^{13}N ($T_{1/2} = 9,97$ min) und ^{11}C ($T_{1/2} = 20,4$ min) erfüllen diese Voraussetzung. Als Positronenstrahler erzeugen beide beim radioaktiven Zerfall ein β^+ Teilchen (Tabelle 4, S.27), das im Pflanzengewebe jedoch nur eine geringe Reichweite hat, da es schnell mit einem Elektron reagiert und bei seiner Vernichtung eine γ -Strahlung mit einer Energie von 511 keV aussendet. Diese γ -Strahlung vermag das Gewebe der Pflanze zu durchdringen und kann gemessen werden. Nach einer Pulsmarkierung können so über einen Zeitraum von 1 bis 2 Stunden Stoffströme verfolgt werden, ohne dass die Pflanze geerntet werden muss. Wegen der kurzen Halbwertzeiten sind auch mehrere Applikationen nacheinander an derselben Pflanze möglich. Dies ist vor allem deshalb als Vorteil zu nennen, weil alle Tracerexperimente von den Kulturbedingungen und dem Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst werden. Durch Experimente an

Einzelpflanzen können so Trends für die Verlagerungen von Stoffen aufgezeigt und Verteilungsmechanismen diskutiert werden, eine exakte Angabe der Transportraten ist wegen der geringen Wiederholungen jedoch nicht ohne weiteres möglich.

^{13}N kann aber auch vorteilhaft bei Studien zur Nährstoffaufnahme über die Wurzel eingesetzt werden. Wird $^{13}\text{NO}_3^-$ in kurzzeitigen Markierungsversuchen verwendet, so ist es möglich, neben der klassisch ermittelten Nitrat-Nettoaufnahme auch den Nitratinflux aufzuzeichnen. Dies ist bei stressphysiologischen Fragestellungen von Vorteil, wenn aufgeklärt werden soll, ob die durch eine Substanz hervorgerufene Verminderung der Nettoaufnahme auf einen verstärkten Efflux oder auf eine gehemmte Aufnahme von Nitrat zurückzuführen ist.

Für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Versuche wurden zwei Pflanzenarten ausgewählt, die Nitrat vorrangig im Spross (*Brassica napus* L.) oder in der Wurzel (*Lupinus albus* L.) reduzieren. Ziel der Untersuchungen war es, sich Unterschiede in der Nitrataufnahme und Nitratverlagerung der beiden Versuchspflanzen zu Nutze zu machen und einen Beitrag zum Verständnis der N-Aufnahme zu liefern. Hintergrund der Arbeit bildete eine Hypothese (**Ben Zioni**, 1971), die Kalium eine bedeutende Rolle bei der NO_3^- -Aufnahme zuschreibt und die auch in jüngster Zeit noch widersprüchlich diskutiert wird.

Neben dem Aufzeichnen von Nitrat-Aufnahmekinetiken unter verschiedenen Anzuchtbedingungen erfolgte auch eine Analyse des Pflanzenmaterials auf Anionen und Kationen. Dabei war neben den Nitratgehalten in den unterschiedlichen Pflanzenorganen auch die Zusammensetzung des Xylemsaftes Bestandteil der Untersuchungen.

Das Stickstoffisotop ^{13}N wurde zur Erstellung von Nitrataufnahme-Kinetiken, bei Versuchen zur Induktion der Nitrataufnahme und dem Einfluss von K^+ auf die Nitrataufnahme eingesetzt. Als weitere Isotope wurden ^{14}C und ^{11}C verwendet, um den Transport von Assimilaten und die Abgabe von HCO_3^- in die Nährlösung bei unterschiedlicher Nitraternährung und unter Kaliummangel zu verfolgen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Beiträge zu folgender Fragestellung erarbeitet :

- a) Wie spiegeln sich die Unterschiede im Ort der Nitratreduktion, in den Mechanismen zur Nitrataufnahme, den Aufnahmekinetiken und den Nitratgehalten in unterschiedlichen Pflanzenteilen oder im Xylemsaft wider?
- b) Welche Rolle spielt Kalium bei der Nitrataufnahme? Lassen sich Unterschiede im Nitratgehalt zwischen Pflanzen unter K-Mangel und Pflanzen mit normaler K-Versorgung feststellen? Ist die Nitrataufnahme verändert und falls ja, liegt dieser Änderung ein modifizierter Influx oder Efflux zugrunde?
- c) Gibt es aufgrund der Verzahnung von Nitrataufnahme und Kohlenstoff-Stoffwechsel Auswirkungen vom N-Angebot auf den Assimilattransport zur Wurzel ? Spielt Kalium bei diesen Vorgängen eine Rolle?
- d) Lassen sich wegen der Rolle von Äpfelsäure als Transport-Metabolit der Photosynthese Unterschiede in den Malatgehalten von Pflanzen erkennen, die mit verschieden hohen NO_3^- -Konzentrationen ernährt wurden? Hat Kalium hier einen Einfluss auf die Malatgehalte?

2 Literaturübersicht

Bei Untersuchungen zur Nährstoffaufnahme aus Nährlösungskulturen wurde schon frühzeitig von einer Alkalisierung des Mediums berichtet, wenn Nitrat als N-Quelle angeboten wurde. Anfangs war unklar, ob das Driften des pH-Wertes in den alkalischen Bereich durch eine Aufnahme von H^+ aus der Nährlösung oder aber durch eine Abgabe von OH^- von der Pflanze verursacht wird. Seither hat sich die Meinung durchgesetzt, dass eine mit der Nitrataufnahme gekoppelte Abgabe von Hydroxylionen der Grund für den Anstieg des pH-Wertes ist. Welche Rolle die Abgabe von OH^- dabei spielt, ist aber noch umstritten, da ähnliche Beobachtungen bei Versuchen mit der Anzucht im Boden nicht gemacht werden konnten.

Dijkshoorn (1958) fand bei Topfversuchen zur Abhängigkeit des Wachstums vom Stickstoffangebot (0,140, 560 oder 700 mg N / Pflanzgefäß in Form von NH_4NO_3), dass sich bei mehrjährigem Ryegrass das Kationen/Anionen-Verhältnis der Pflanzen im Laufe ihrer Entwicklung ändert. Nach dem ersten Schnitt in 3 cm Höhe wurde der Wiederaufwuchs des Ryegrass über 45 d verfolgt. Bis 28 d nach dem Schnitt wurde eine Zunahme des NO_3 -N und Gesamt-N der Pflanzen beobachtet. Bis 40 d nach dem Schnitt stieg der in den Proteinen vorliegende Stickstoff zwar noch auf Kosten des NO_3 -N an, die Summe aller N-Komponenten blieb jedoch gleich. Bis 48 d nach Versuchsbeginn folgte dann sogar ein Rückgang des Gesamtstickstoffs / g TM. Die Änderung in der Zusammensetzung des N-Pools von Ryegrass ging einher mit einem Anstieg des Kationen/Anionen-Verhältnisses der Pflanzen von anfänglich 0,45 auf 0,55 nach 25 Tagen bzw. auf 0,7 nach 35 Versuchstagen. Ein signifikanter Anstieg des Kationen/Anionen-Verhältnisses war jedoch erst zu dem Zeitpunkt zu beobachten, da der NO_3^- -Vorrat des Bodens erschöpft und der NO_3^- -Gehalt der Pflanzen um mehr als eine Größenordnung abgesunken war. Als Erklärung für seine Beobachtungen schlug **Dijkshoorn** (1958) ein 3-Phasen-Modell der Nitrataufnahme mit unterschiedlichen Aufnahmemechanismen vor:

1. Werden die Wurzeln zum ersten Mal mit NO_3^- in Kontakt gebracht, so erfolgt anfänglich die Aufnahme der Kationen und Anionen im Verhältnis 1:1. (Kation/ NO_3^- -Symport).

2. Nachdem eine ausreichende Menge an Nitrat aufgenommen wurde, setzt ein neuer Aufnahmemechanismus ein. Jetzt wird Nitrat im Austausch gegen Hydroxylionen aufgenommen (Antiport), was sich in einer Alkalisierung des Nährmediums bemerkbar macht. Da die Nitrataufnahme jetzt nicht mehr an Kationen gekoppelt ist, sinkt die Aufnahmerate der Kationen und somit das Kationen/Anionen-Verhältnis der Pflanzen.
3. Dieser Zyklus kann zum Erliegen kommen, wenn entweder der NO_3^- -Vorrat im Boden verbraucht ist, oder aber das in der Wurzel vorliegende HCO_3^- zur Synthese von organischen Säuren aufgebraucht wird und so nicht mehr für einen $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ -Antiport zur Verfügung steht. In beiden Fällen ist dann wieder ein Anstieg des Kationen/Anionen-Verhältnisses der Pflanzen zu erwarten.

Dieses Modell wurde von **Ben Zioni** et al. (1971) aufgegriffen und im Hinblick auf die HCO_3^- -Abgabe bzw. die Synthese von Malat näher untersucht. Mit einem Puls-Experiment konnte gezeigt werden, dass $^{14}\text{CO}_2$, das Tabakpflanzen über die Blätter angeboten wurde, nach einiger Zeit als $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ im Nährmedium nachweisbar war.

Bei Pflanzen, denen statt NO_3^- Chlorid in der Nährlösung angeboten wurde, war die HCO_3^- -Abgabe über die Wurzeln deutlich reduziert, was auf einen Zusammenhang zwischen NO_3^- -Aufnahme und HCO_3^- -Abgabe hinweist. In einem Versuch zur Reinduktion der NO_3^- -Aufnahme wurden Tabakpflanzen nach Anzucht mit 2.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ für einige Tage auf ein N-Mangelmedium gesetzt. Je länger die Pflanzen ohne NO_3^- kultiviert wurden, desto enger war das Verhältnis der NO_3^-/K^+ -Aufnahme bei der Reinduktion: 80:1 im steady state; 11:1 nach einem Tag N-Mangel; ca. 2:1 nach 3 oder mehr Tagen N-Mangel. Unabhängig von der Aufnahmerate war das NO_3^-/K^+ -Verhältnis im Xylemsaft jedoch nahezu 1, was auf einen Regelmechanismus beim Ferntransport von Nitrat hindeutet.

In einem weiteren Versuch wurde der Zusammenhang zwischen Malatakkumulation und Nitrataufnahme untersucht. Nach dem Entfernen von Nitrat aus dem Medium stieg der Malatgehalt in den Wurzeln der Tabakpflanzen, nicht jedoch in den Wurzeln von dekapitierten Pflanzen. Bei erneuter Zugabe von Nitrat (5 mM KNO_3^-) sank die Malatkonzentration in den Wurzeln wieder, was als Indiz für die einsetzende Decarboxylierung und das Aktivieren eines $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ -Antiporters interpretiert wurde. Mit

ihren Ergebnissen schlugen **Ben Zioni** et al. (1971) ein plausibles Modell vor, in dem Kalium eine vermittelnde Rolle zwischen N- und C-Stoffwechsel zugeordnet wird (siehe auch Abbildung 1). Als wichtige Voraussetzung für die Gültigkeit des Modells ist zu nennen, dass die Nitratreduktion vorrangig in den Blättern der Pflanze erfolgen muss und, dass die Nitrataufnahme mit einer Abgabe von HCO_3^- in die Nährlösung gekoppelt ist.

In dem vorgestellten Modell werden die folgenden 5 Phasen der Nitrataufnahme und der nachgeschalteten Prozesse unterschieden:

1. Nitrat wird von den Wurzeln der Pflanze zusammen mit Kalium aufgenommen.
2. Beim Ferntransport im Xylem dient K^+ als Gegenion zu dem in großen Mengen aufgenommenen Nitrat und gewährleistet so einen Ladungsausgleich zwischen Anionen und Kationen.
3. In den Blättern erfolgt die Nitratreduktion, wobei das anfallende OH^- mit CO_2 zu HCO_3^- umgesetzt und über Phosphoenolpyruvat in Malat übergeführt wird.
4. Malat wird mit K^+ als Gegenion im Phloem zu den Wurzeln transportiert, wo die Decarboxylierung erfolgt.
5. Jetzt ist keine weitere (oder nur eine verringerte) Aufnahme von K^+ nötig, da NO_3^- mit Hilfe eines $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ -Antiporters aus der Nährlösung aufgenommen werden kann.

Da K^+ nach diesem Modell in der Pflanze zwischen Xylem und Phloem zirkuliert, wird von einem K-Shuttle gesprochen. Auf der Basis des von **Ben Zioni** vorgeschlagenen Modells fanden Untersuchungen an mehreren Pflanzenspezies statt, die sich zum Ziel setzten, die Zusammenhänge bei der Aufnahme von K^+ mit unterschiedlichen Anionen aufzuklären. **Blevins** et al. (1974) führten Untersuchungen an Gerstenpflanzen durch, um den Grund für die höheren K^+ -Aufnahmeraten aus KNO_3 gegenüber KCl zu erklären. Während bei Gerstenpflanzen, die mit KCl oder KNO_3 im Dunkeln angezogen wurden, der K^+ Gehalt fast gleich war, wurden bei Beleuchtung der Pflanzen in den mit Nitrat ernährten Pflanzen wesentlich höhere Kaliumgehalte und eine wesentlich größere

Menge an organischen Säuren gefunden. Die Stimulation der Malatsynthese durch die Nitrataufnahme erfordert aber auch, dass ein Ladungsausgleich der organischen Anionen durch Kationen erfolgt.

Als Grund für die erhöhten Kaliumgehalte der NO_3^- -Pflanzen kommt neben der erhöhten Nitrattransportrate (wobei K^+ als Gegenion beim Ferntransport dient) auch noch die

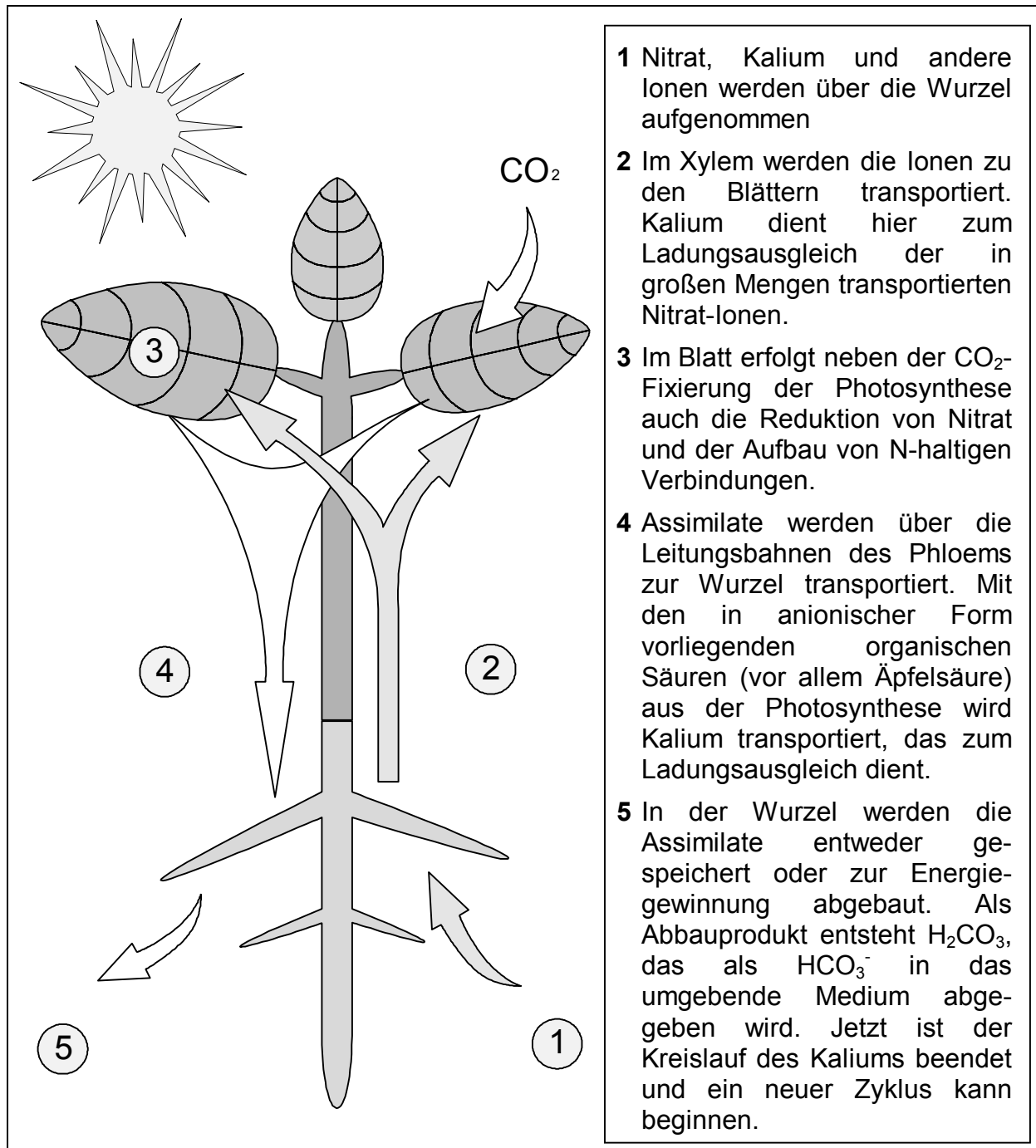


Abbildung 1: Modell zur Funktion eines möglichen K-Shuttles in der Pflanze (Ben Zioni et al., 1971), mit Verbindung zwischen Nitrataufnahme, Nitrattransport und Nitratreduktion (rechte Seite) und CO_2 -Fixierung, Assimilattransport und HCO_3^- -Abgabe in den Wurzeln (linke Seite).

Tatsache zum Tragen, dass das am Ort der Nitratreduktion gebildete Malat in den Zellen nur mit einem entsprechenden Gegenion gelagert werden kann.

Arbeiten von **Kirkby** (1977; 1981) und **Armstrong** (1979) zeigten, dass bei Tomaten mit hoher K^+ -Versorgung die Rezirkulation eine untergeordnete Rolle spielt. Berechnungen des Ca^{2+}/K^+ -Verhältnisses im Xylemsaft und der Anreicherungen der Ionen im Spross ergaben, dass nur ca. 20 % des im Xylem transportierten K^+ aus dem K-Shuttle stammen. Bei hohem K^+ -Angebot (4 mM) akkumulieren Tomaten organische Säuren und zeigen nur einen schwachen HCO_3^- -Efflux. Bei geringem Angebot von Kalium (0,4 mM) hingegen wird ein beträchtlicher Teil der Anionenladung wieder als HCO_3^- in die Nährlösung ausgeschieden (**Kirkby** 1981). Da bei Tomaten auch nur ein geringer HCO_3^- - Efflux zu verzeichnen war, ist jedoch eine der Voraussetzungen für die Gültigkeit des Ben Zioni-Modells nicht erfüllt gewesen.

Kirkby et al. (1980) untersuchten an *Ricinus communis* L. (1.0 und 10 mM NO_3^-) den Umfang der K^+ -Zirkulation in den Pflanzen sowie die HCO_3^- -Abgabe und die Translokation von organischen Säuren vom Spross in die Wurzeln. Für beide Kulturbedingungen konnten im Xylem und Phloem ausreichend hohe K^+ Gehalte gemessen werden, welche die Funktion des K^+ als Gegenion zu NO_3^- oder Malat nach dem **Ben Zioni**-Modell unterstützen würden. Während bei der 10 mM-Variante der Nitratgehalt im Xylem ca. 3-mal über dem Gehalt der 1 mM-Variante lag, bewegten sich die K^+ -Gehalte in der gleichen Größenordnung, was ebenfalls für eine Zirkulation des K^+ sprechen würde. Die Aufnahmerate der Anionen war bei diesen Untersuchungen doppelt so hoch wie die der Kationen, und es wurde der erwartete HCO_3^- -Efflux beobachtet. Der Mechanismus, nach dem die negative Ladung vom Malat oder anderen organischen Säuren über das Phloem in die Wurzeln transportiert und anschließend als HCO_3^- abgegeben wird, blieb jedoch weiterhin unklar.

In einer weiteren Arbeit mit Rizinus stellten **van Beusichem** et al. (1985) die Gültigkeit des **Ben Zioni**-Modells in Frage. Bei ihren Versuchen wurde etwa die Hälfte des aufgenommenen Nitrats bereits in den Wurzeln reduziert (NRA-Tests) und es konnte nur eine geringe NO_3^- -Konzentration in den Blättern nachgewiesen werden. Trotz intensiver HCO_3^- -Exkretion der Wurzeln ließ sich nachweisen, dass nur ca. 20% des abgegebenen HCO_3^- direkt aus den Sprosstteilen der Pflanze stammten. Die verbleibenden 80% müssen demnach aus in der Wurzel gespeichertem oder durch Wurzelatmung erzeugtem HCO_3^- stammen. Auch Malat scheint bei der Translokation

der Ladung eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn das Malat/ K^+ -Verhältnis im Phloemsaft der Rizinuspflanzen war sehr niedrig. Da die Reduktion des Nitrats bei diesen Pflanzen zur Hälfte in den Wurzeln erfolgte, war jedoch eine grundlegende Annahme des **Ben Zioni**-Modells nicht erfüllt und die Notwendigkeit der Rezirkulation des K^+ nicht unbedingt gegeben.

Engels et al. (1992^a) untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Wurzelzonen - und Sprossbasistemperaturen auf die Verlagerung von K^+ in Mais. Sie konnten zeigen, dass mit steigender Sprossbasistemperatur der K^+ -Bedarf des Sprosses anstieg, wobei die K^+ - Aufnahme in den Wurzeln unbeeinflusst blieb. Um die Entkopplung von K^+ - Aufnahme und Transfer ins Xylem zu erklären, schlugen sie einen Kontrollmechanismus bei der Abgabe des K^+ ins Xylem vor. Da die K^+ - Gehalte des Xylemsafts von dekapitierten Pflanzen deutlich über der Nettoakkumulation im Spross liegen, scheint hier eine K^+ - Rezirkulation stattzufinden. Dies wiederum würde für die Gültigkeit des Ben Zioni-Modells sprechen.

Bei Untersuchungen zum diurnalen Rhythmus der Nitrataufnahme von Luzerne fand **Plhak** (1992), dass die tageszeitlichen Schwankungen des Nitratgehalts in Blättern, Sprossachse und Wurzeln eng mit den K^+ -Gehalten korreliert sind. Da die Nitratreduktion der Luzerne vorrangig im Spross abläuft, darf davon ausgegangen werden, dass bei dieser Spezies das **Ben Zioni**-Modell eine Rolle spielt.

Ein anderer Ansatz zum Verständnis der Vorgänge bei der Nitrataufnahme wurde von der Elektrophysiologie gewählt. Da die Aufnahme von Nitrat zu einer Alkalisierung des Nährmediums führt, wurde anfangs von einem NO_3^-/OH^- oder einem NO_3^-/HCO_3^- Antiporter bei der Nitrataufnahme ausgegangen. Neuere Arbeiten sprechen hingegen für einen Cotransport von 2 H^+ mit 1 NO_3^- . Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass die Zellen auf Nitrat mit einer Depolarisation des Membranpotentials reagieren. Dies kann nur mit einem Überschuss an aufgenommenen Kationen (hier H^+) erklärt werden. Für die sich an die Depolarisation anschließende Repolarisationsphase gab es anfangs keine eindeutigen Erklärungen.

Ullrich (1987) schlägt nach Untersuchungen an *Lemna gibba* L. einen NO_3^-/H^+ -Symport mit einer Stöchiometrie < 1 vor, wobei die Nitrataufnahme mit einem passiven H^+ -Influx kombiniert ist. In seinen Experimenten sank das Membranpotential von *Lemna gibba*

bei der Zugabe von 2 mM NO_3^- von -198 mV auf -129 mV. Auf diese Depolarisation folgte jedoch innerhalb von 5 min wieder eine Repolarisierung des Membranpotentials. Ein $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ -Antiporter kann die anfängliche Depolarisierung der Zellmembran nicht erklären, weshalb **Ullrich** einen NO_3^-/H^+ Symport vorgeschlägt. Im ersten Schritt der Nitrataufnahme werden durch die H^+ ATPase 2 H^+ in das externe Medium gepumpt. Dabei wird ATP gespalten, da dieser Transport gegen das bestehende elektrochemische Potential erfolgt. Im zweiten Schritt können dann mehrere H^+ mit NO_3^- im Cotransport wieder in die Zelle aufgenommen werden. In diesem Fall wäre die eigentliche Nitrataufnahme ein passiver Vorgang. Mit 2 mM war das NO_3^- -Angebot bei diesen Versuchen jedoch recht hoch gewählt, da zumindest für höhere Pflanzen zurzeit zwei unterschiedliche Systeme der Nitrataufnahme unterschieden werden (**Siddiqi et al**, 1990). Es ist daher anzunehmen, dass sich *Lemna gibba* bei dem hohen NO_3^- -Angebot bereits im Bereich des *Low Affinity Transport System* (Abbildung 37, S.117) der Nitrataufnahme befand, bei dem energieabhängige Carrier keine bedeutende Rolle spielen.

Für Mais schlagen **McClure et al.** (1990) einen Nitrat-induzierbaren NO_3^-/H^+ -Symport mit der Stöchiometrie von 2 vor. In ihren Versuchen hemmten H^+ ATPase-Inhibitoren (und ein hoher externer pH) sowohl die Depolarisation als auch die Repolarisationsphase. Dies spricht für das Mitwirken einer H^+ ATPase bei der Nitrataufnahme und für die Kopplung von NO_3^- und H^+ in Form eines Symporters.

Thibaud und Grignon (1981) zeigten an nicht induzierten Maispflanzen, dass diese in den ersten Stunden nach der Induktion mit Nitrat noch H^+ abgeben, während induzierte Pflanzen scheinbar H^+ aufnahmen. Da die induzierten Pflanzen auf Nitrat mit einer Hyperpolarisation reagierten, die nach Entzug von Nitrat wieder zurückging, schlugen sie einen 2 $\text{NO}_3^-/\text{OH}^-$ -Antiporter vor. Die Mitwirkung einer H^+ ATPase wurde verworfen, da DES (ein H^+ ATPase - Inhibitor) keinen Einfluss auf die Hyperpolarisation nach der Zugabe von NO_3^- zeigte. Dies steht im Gegensatz zu dem Modell von **Ullrich und Novacky** (1990), die für *Limnobia* das Auftreten einer Hyperpolarisation mit der Aktivierung einer H^+ ATPase verbinden.

Auch durch das Aufzeichnen von Nitrat-Aufnahmekinetiken wurden wertvolle Beiträge zur Aufklärung der Zusammenhänge bei der Nitrataufnahme geliefert. Bei der

Aufnahme von Nitrat muss nicht nur zwischen induzierten (NO_3^- -Ernährung) und nicht-induzierten Pflanzen (NH_4^+ -Ernährung) unterschieden werden, sondern es ergeben sich auch beträchtliche Unterschiede in den Aufnahmeraten in Abhängigkeit von der Nitratkonzentration.

Siddiqi et al. (1990) zeigten an induzierten Gerstenpflanzen, dass die Nitrataufnahme zweiphasig ist. Im Bereich bis ca. 250 μM fanden sie bei ^{13}N -Versuchen Influxraten, die einer Michaelis-Menten-Kinetik folgten, während bei höherem Nitratangebot die Influxraten linear anstiegen. Das Aufnahmesystem im hohen Konzentrationsbereich zeigte bis 50 mM keine Sättigung, besaß eine geringe Affinität zum Substrat und war vergleichsweise nur wenig hemmbar. Bei längeren Expositionszeiten unterlag es allerdings einer negativen Rückkopplung. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Aufnahmesystem (*Low Affinity Transport System*) um einen passiven Transport (evtl. Influx über Ionenkanäle) handelt. Ein Widerspruch ergab sich jedoch aus der Tatsache, dass beispielsweise bei 1 mM NO_3^- im Medium eine Aufnahme stattfand, obwohl der cytoplasmatische Nitratgehalt über 5 mM lag.

Das Aufnahmesystem im niedrigen Konzentrationsbereich ist durch NO_3^- induzierbar (**Siddiqi et al, 1990**) und besitzt eine hohe Affinität zum Nitrat (*High Affinity Transport System*). Während der Induktionsphase steigt v_{MAX} an und erreicht ein Maximum. Ist eine ausreichend hohe Nitratkonzentration im Cytoplasma erreicht ("kritische cytoplasmatische Nitratkonzentration"), so unterliegt die Aufnahme der negativen Rückkopplung und v_{MAX} wird reduziert. Das induzierte Carrier-System ist jedoch nicht beständig, sondern es wird innerhalb weniger Tage abgebaut (Deinduktion). Dies belegen Untersuchungen, bei denen die Pflanzen nach fortlaufender Dauer auf NO_3^- -freiem Medium immer geringere Raten bei der Reinduktion mit Nitrat zeigten (**Siddiqi et al, 1989**).

Im Hinblick auf den Ort der Nitratreduktion und den Transfer von Nitrat bzw. reduzierten Verbindungen wurden ^{15}N -Versuche mit Maispflanzen durchgeführt (**Mackown et al, 1983**). Es konnte gezeigt werden, dass das aufgenommene $^{15}\text{NO}_3^-$ entweder sofort reduziert oder in das Xylem transportiert wurde. Ein Efflux von ^{15}N fand nicht statt, wohl aber ein Efflux des in den Zellen bereits vorhandenen ^{14}N . Um dieses Phänomen zu erklären, wurde von **Siddiqi et al. (1990)** das folgende Modell vorgeschlagen: In den Epidermiszellen der Wurzeln (geringe NO_3^- -Konzentration, hohe

Nitratreduktaseaktivität) wird aufgenommenes Nitrat entweder sofort reduziert oder an die Cortexzellen weitergegeben. In den Cortexzellen ist die NO_3^- -Konzentration wesentlich höher (1-37 mM), aber es findet kaum eine Reduktion statt. Von den Cortexzellen wird das Nitrat weiter bis zur Endodermis und dann über die Stele in das Xylem weitergeleitet.

Die somit recht niedrigen Nitratkonzentrationen (im μMol -Bereich) in den Epidermiszellen ermöglichen das passive Eindringen von Nitrat nach dem *Low Affinity Transport System* (LATS). Da die Cortexzellen den Großteil des Wurzelgewebes (~70%) ausmachen und zudem hohe Nitratgehalte besitzen, wurde angenommen, dass der beobachtete N-Efflux aus diesen Zellen und nicht aus den Epidermiszellen (~7% der Wurzelmasse) stammt.

Seit den Arbeiten von **Hoagland** und Broyer (1936) ist die Wurzelaufnahme von Ionen, nach vorausgegangenem Mangel, das Ziel vieler Untersuchungen gewesen. Die Regulierung des cytoplasmatischen K^+ -Gehalts spielt bei Untersuchungen zur Aufnahme von K^+ eine wesentliche Rolle. So konnten **Memmon** et al. (1985) zeigen, dass Gerstenpflanzen die cytoplasmatische K^+ -Konzentration bei 150 mM halten, wobei die Vakuole als Speicher benutzt wird. Während bei kurzer Versuchsdauer der K^+ -Gehalt der Vakuole vernachlässigt werden kann, muss er bei längeren Versuchen als wichtiges Glied bei der Regulierung der K^+ -Fluxe (besonders bei K^+ -Mangel) in Betracht gezogen werden.

Epstein et al (1963) berichteten von einem zweiphasigen Mechanismus bei der Aufnahme von K^+ . Ähnlich der Nitrataufnahme existiert für die Kaliumaufnahme ein *High Affinity Transport System* (**HATS**) und ein *Low Affinity Transport System* (**LATS**) (**Kochian** und Lucas, 1982).

Wird Gerste mit 1 mM K^+ angezogen, so wird das HATS (induzierbar, aktiver Transportmechanismus) zu Gunsten des zweiten Aufnahmemechanismus (nicht induzierbar, passiv) gehemmt (**Glass**, 1976; **Siddiqi** und Glass, 1987). Pflanzen, die mit 1 mM K^+ vorbehandelt und dann auf 100 μM K^+ umgesetzt wurden, zeigten Aufnahmeraten, die bei $1/20$ der kontinuierlich mit 100 μM K^+ angezogenen Pflanzen lagen. Offensichtlich findet bei hohem K^+ -Angebot nur die Aufnahme über den

elektrochemischen Gradienten mit Hilfe eines Ionenkanals statt. Im Gegensatz zur Nitrataufnahme unterliegt hier das LATS nicht der Feedback-Regulation.

Werden Gerstenpflanzen von hoher auf niedrige K^+ Ernährung umgesetzt, so wird das HATS induziert (**Fernando** et al, 1992). Zunächst findet der K^+ -Transport vom Cytosol zur Stele mit unverminderter Geschwindigkeit, bei verminderter Aufnahmerate aus dem Medium, statt. Die Umkehr des elektrochemischen Gradienten führt jetzt zu einer schnellen De-Repression des HATS, an die sich die Synthese von neuen Carriern anschließt. Bei den neu gebildeten Transportproteinen handelt es sich um K^+/H^+ -Symporter, da das Einströmen mit einer Depolarisation des Membranpotentials verbunden ist. Werden die Pflanzen auf ein K^+ Mangelmedium gesetzt, so bleibt die K^+ Konzentration im Cytoplasma dennoch über eine längere Zeitspanne bei 150 mM, da in diesem Fall über einen K^+/H^+ -Symport (unter Energieverbrauch) aus der Vakuole K^+ ins Cytosol transportiert wird. Dieser Prozess wird abgebrochen, wenn die K^+ -Konzentration der Vakuole auf ca. 20 mM gesunken ist.

Die Klärung der Frage, ob bzw. in welchem Umfang das von **Ben Zioni** (1971) vorgestellte Modell zur Funktion eines K-Shuttles bei der Nitrataufnahme (Abbildung 1) eine Rolle spielt, ist vor dem Hintergrund der zusammengetragenen Kenntnisse noch offen und bietet Anlass für weitere Untersuchungen. Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Untersuchungen sind als Beitrag zu diesem Thema zu sehen.

3 Material und Methoden

3.1 Abkürzungen

FM	Frischmasse
HATS	High Affinity Transport System der NO_3^- -Aufnahme
LATS	Low Affinity Transport System der NO_3^- -Aufnahme
NR	Nitratreduktase
NR-Test	Nitratreduktase-Test
NRA	Nitratreduktaseaktivität
RGR	relative Wachstumsrate (relative growth rate)
TM	Trockenmasse

3.2 Versuchspflanzen und Kulturbedingungen

Für die Durchführung der vorliegenden Versuche wurden zwei Pflanzenspezies benötigt, von denen eine das aufgenommene Nitrat überwiegend im Spross, die andere den aufgenommenen Stickstoff hingegen bevorzugt in der Wurzel reduziert. Nach Vorversuchen wurden dann die in 3.2.1 vorgestellten Pflanzenspezies ausgewählt.

3.2.1 Versuchspflanzen

Für die vorliegenden Versuche wurde mit Raps (*Brassica napus* L.) eine Pflanzenart verwendet, die Nitrat vorzugsweise im Spross reduziert. Dazu wurde ungebeiztes Saatgut (Winterraps Liberator-00) von der Deutschen Saatveredelung (Lippstadt-Bremen GmbH) aus Weeze bezogen. Als Pflanzenspezies, die Nitrat bereits zum großen Teil in der Wurzel reduziert, wurde die Lupine (*Lupinus albus* L.) ausgewählt. Das Saatgut, unbehandelte Samen der früh reifenden Sorte AMIGA, stammte von der Südwestdeutschen Saatzucht in Rastatt.

Um einen Vergleich mit den in der Literatur verfügbaren Pflanzenspezies zu erhalten, wurde in einigen Fällen auch Gerste (*Hordeum vulgare* L., Wild-Typ) eingesetzt.

3.2.2 Anzuchtbedingungen

Bis zur Aussaat wurde das Saatgut bei 4°C gelagert. Lupinensamen wurden 6 bis 8 Stunden vor der Saat in ein gut belüftetes Gefäß mit 0,5 mM CaSO_4 -Lösung gebracht, um dort zu quellen.

Die Samen wurden in Plastik-Blumentöpfen, die mit Vermiculit™ gefüllt waren, ausgelegt und mit einer etwa 5 mm hohen Schicht Vermiculit™ abgedeckt. Danach wurden die Blumentöpfe in Übertöpfe gestellt, und es wurden 200 ml 0,5 mM CaSO_4 zugegeben. Für 3 bis 4 Tage wurden die Gefäße dann in ein Keimbecken (Floratherm™) bei 30 °C gestellt. Die Luftfeuchte im Keimbecken betrug ca. 90 % und die Lichtstärke lag bei 200 $\mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Nach dem Auflaufen, wenn die Keimlinge eine Größe von 3 bis 4 cm erreicht hatten, wurden die Pflanzenwurzeln vorsichtig von Vermiculitresten befreit und die Pflanzen auf Nährlösung umgesetzt.

Für Induktionsversuche zur Nitrataufnahme konnte das Keimen der Pflanzen nicht auf Vermiculit™ erfolgen, da in diesem Material geringe Mengen von Nitrat enthalten sind. Hier wurden die Samen auf einem mit Kies überschichteten Sieb ausgelegt, unter dem eine 0,05 M CaSO_4 - Lösung so stark mit Luft durchperlt wurde, dass die Samen gut befeuchtet waren. Das Keimen unter diesen Bedingungen dauerte länger als die Keimung auf Vermiculit™, und die Pflanzen konnten erst nach 5 bis 6 Tagen auf Nährlösung umgesetzt werden.

3.2.3 Kulturbedingungen

Die Aufzucht der Nitrat-ernährten Versuchspflanzen erfolgte mit einer modifizierten Hoagland-Lösung (Tabelle 1). Der pH-Wert der Nährlösung in den Anzuchtbecken wurde über einen pH-Stat kontrolliert und durch Zugabe von 0,01 N H_2SO_4 auf pH 5,6 gehalten. Während der gesamten Anzucht wurde der Nitratgehalt der Nährlösungen täglich kontrolliert und mit $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ neu eingestellt. Die Bestimmung der NO_3^- -Konzentration erfolgte photometrisch bei 210 nm, wobei eine NO_3^- -freie Nährlösung als Kontrolle diente.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung (nach **Wieneke**, 1994)

<u>Massenelemente</u>	<u>Spurenelemente</u>
50-1250 $\mu\text{M Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,018 mM Fe-EDTA
0,5 mM CaSO_4	0,012 mM H_3BO_3
0,3 mM K_2SO_4	0,25 $\mu\text{M CuSO}_4$
0,1 mM KH_2PO_4	0,25 $\mu\text{M ZnSO}_4$
0,3 mM MgSO_4	0,25 $\mu\text{M MnCl}_2$
	0,125 $\mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$

Bei den Versuchen zur Induktion der Nitrataufnahme wurde während der Anzucht $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-Quelle angeboten. Aus den Anzuchtbecken wurde täglich eine Probe entnommen und der Ammoniumgehalt mit einer Ionen-sensitiven Elektrode (Orion 9512 Ammonia Elektrode) bestimmt. Als Messgerät diente ein Ionenanalysator (Expanded ION Analyzer EA 940, Orion Research). Der Ammoniumgehalt wurde durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wieder auf den Sollwert gebracht.

Bei Versuchen, die nicht in der teilklimatisierten Anzuchtkammer erfolgten, wurden die Versuchspflanzen 2 Tage vor Versuchsbeginn in eine voll klimatisierte Klimakammer gebracht, wo sie sich auf die leicht veränderten Kulturbedingungen einstellen konnten. Dies war bei Versuchen zu Influx/Efflux-Kinetiken von ^{13}N und bei den Untersuchungen zur Assimilatverlagerung ($^{11}\text{CO}_2$ / $^{14}\text{CO}_2$) der Fall.

Der Tageszyklus in der Klimakammer war in 16 h Lichtphase und 8 h Dunkelphase unterteilt. Zu Beginn und am Ende der Photoperiode waren Dämmerungsphasen von je 110 min eingeschaltet, die eine schrittweise Anpassung der Pflanzen an Licht bzw. Dunkelheit gewährleisteten. In den Dämmerungsphasen wurden zeitversetzt Glühbirnen (20 W, Osram Dulux EL Energiesparlampen und Philips 60 W-Glühbirnen) eingeschaltet, wobei der Lichtflux bis auf $50 \mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$ stieg. Später erfolgte in Stufen das Zuschalten von Xenonlampen (1000 W Osram HQI - T) und die Quantenausbeute stieg auf $450 \mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Die Lufttemperatur lag während der Tagphase bei $22,5^\circ\text{C}$ (Taupunkt $14,8^\circ\text{C}$) und wurde in der Nachtphase auf $16,0^\circ\text{C}$ (Taupunkt $14,2^\circ\text{C}$) abgesenkt.

3.2.4 Wachstumsraten

Veränderungen in der Frischmasse der Pflanzen wurden mit dem Umsetzen auf Nährlösung durch tägliche Stichproben erfasst. Nach der Ernte wurden die Frischmassen der Fraktionen Blatt, Sprossachse und Wurzel ermittelt. Falls es nötig

Tabelle 2: Formel zur Berechnung der *relativen Wachstumsrate (RGR)* aus der Zunahme der Pflanzenmasse zwischen zwei Probenahmen (nach **Siddiqi** und Glass, 1987; **He** und Cramer 1993).

Gleichung 1	$RGR = \frac{\ln M_2 - \ln M_1}{t_2 - t_1}$
In M_2 , In M_1 : t_2 , t_1 :	natürlicher Logarithmus der Frisch- oder Trockenmasse Tag der Ernte

war, die Trockenmassen zu bestimmen, so wurden die verschiedenen Fraktionen 3 Tage im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde dann die Trockenmasse bestimmt.

Aus dem Frischmassenzuwachs wurde nach **Gleichung 1** (Tabelle 2) die relative Wachstumsrate (*relative growth rate*, RGR) von Spross und Wurzel berechnet.

3.3 Nitrataufnahme

Der Nitratgehalt in Lösungen kann anhand der Absorption bei 210 nm ermittelt werden, wenn keine organischen Stoffe den Test stören. Hier wurde die Absorption der Nährlösungen gegenüber einer nitratfreien Nährlösung bestimmt. Als Messgerät diente ein Mehrkanal-Photometer (UV / VIS Spectrometer Lambda 2, Firma Perkin-Elmer). Da die größte Anzahl der Experimente mit Nitratkonzentrationen von ca. 150 µMol durchgeführt wurde, war eine direkte Messung ohne ein Verdünnen der Nährlösungen möglich.

Für Versuche zur Nitrataufnahme wurden zunächst Lösungen mit den gewünschten Nitratgehalten vorbereitet. Daraufhin wurden jeweils 2 bis 4 Pflanzen aus den Anzuchtbecken entnommen und die Wurzeln kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Nun wurden die Pflanzen auf Bechergläser mit der frischen Nährlösung umgesetzt, die, um eine Beeinträchtigung der Wurzel Aufnahme durch Licht auszuschließen, mit Aluminiumfolie umwickelt waren. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung der Wurzeln wurde in jedes Becherglas eine Kapillare eingeführt, über die Druckluft durch die Nährlösung perlte. Nach ca. 10 bis 45 min wurden die Aufnahmeversuche beendet und die Pflanzen geerntet. Die Wurzeln wurden mit Zellstofftüchern vorsichtig abgetrocknet und zur Bestimmung der Frischmasse gewogen. Aus der Differenz der Nitratkonzentration in den Aufnahmegefäßen vor Versuchsbeginn und zu Versuchsende wurde die Menge des aufgenommenen NO_3^- errechnet. Zusammen mit der Frischmasse der Wurzeln und der Versuchsdauer ließ sich so die Aufnahme rate in µMol Nitrat / g Frischgewicht je Stunde errechnen.

Bei diesen Versuchen wurde das Volumen der Aufnahmegefäße der Größe der Pflanzen und der Versuchsdauer angepasst, damit einerseits eine deutlich messbare Abnahme der Nitratkonzentration gewährleistet war, andererseits aber die Abnahme auch nicht so groß war, dass die Aufnahme rate stark absank. Dabei wurde angestrebt,

dass die Pflanzen während des Versuches ca. 10 % des angebotenen Nitrats aufnahmen.

3.4 Nitratreduktaseaktivität (NRA)

Zur Bestimmung der NRA in den verschiedenen Pflanzenorganen wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt : Der *in vivo* NRA-Test, der die zum Zeitpunkt der Ernte vorliegende Enzymaktivität beschreibt, und der *in vitro* NRA-Test, der als Anhaltspunkt für die maximale Reduktionsleistung des Enzyms angesehen werden kann (Hageman, 1980).

Beiden Enzymtests ist gemein, dass sie unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden müssen, da Sauerstoff die Nitratreduktion hemmt. Darüber hinaus müssen die Enzymtests in Dunkelheit durchgeführt werden, da im Licht die Reaktionen der Photosynthese mit denen der Nitratreduktion um die Reduktionsäquivalente (NADH_2 , NADPH_2) der Zelle konkurrieren.

Bei der Wahl der Testbedingungen musste auch sichergestellt werden, dass nur ein Produkt entsteht, dessen Konzentration später bestimmt werden kann. Da die Reduktion von Nitrat im Cytoplasma beginnt, um dann in der Nitritreduktion in den Chloroplasten ihre Fortsetzung zu finden (vgl. Tabelle 3), bot es sich an, die Reaktionskette an dieser Stelle zu unterbrechen. Dazu reichte das Ablaufen der Reaktion im Dunkeln aus, da der Reduktionsschritt in den Chloroplasten sehr energieaufwändig ist und in dieser Organelle durch das Fehlen der Lichtreaktion keine weiteren Reduktionselemente gebildet werden können.

Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen verlief die Reduktion folglich nur bis zur Stufe des Nitrits, das mit photometrischen Methoden nachgewiesen wurde.

3.4.1 In vivo Nitratreduktasetest

Da die NRA tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, wurden zur Gewährleistung vergleichbarer Versuchsbedingungen alle Pflanzen 4 h nach dem Einsetzen der Photoperiode geerntet. Die Pflanzen wurden dabei in die Fraktionen Blatt, Sprossachse und Wurzel getrennt, wobei die Wurzeln 3 mal mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend vorsichtig abgetrocknet wurden.

Tabelle 3: Reaktionsschritte bei der Reduktion von Nitrat zu Ammonium und dem Einbau des Stickstoffs in organische Verbindungen

Gleichung 2	Nitratreduktase $\text{NO}_3^- + \text{NADPH} + \text{H}^+$	<i>Cytoplasma</i> →	$\text{NO}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
Gleichung 3	Nitritreduktase $\text{NO}_2^- + 6 \text{e}^- + 8 \text{H}^+$	<i>Chloroplast</i> →	$\text{NH}_4^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$
Gleichung 4	Glutamatdehydrogenase $2\text{-Oxo-Glutarat} + \text{NH}_3 + 2 \text{NADPH} + \text{H}^+$	→	Glutamat + 2 NADP^+
Gleichung 5	Glutaminsynthetase $\text{Glutamat} + \text{NH}_3 + \text{ATP}$	→	Glutamin + ADP + P_i
Gleichung 6	Glutamatsynthase = Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) $\text{Glutamin} + 2\text{-Oxo-Glutarat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	→	2 Glutamat + NADP^+

In der Zwischenzeit wurden der Inkubationspuffer und die **Startlösung** (120 mM KNO_3) auf Eis gekühlt und mit N_2 durchperlt, um den Sauerstoff-Partialdruck in den Testlösungen abzusenken.

Nach der Ernte wurden die verschiedenen Pflanzenfraktionen mit dem Skalpell in kleine Stücke von ca. 2 mm Länge geschnitten, auf der Analysenwaage in Portionen von 150 bis 300 mg Frischgewicht eingewogen und in Glasgefäße übergeführt. Nach Zugabe von 3 ml **Inkubationspuffer**¹ wurden die Probenfläschchen verschlossen und vorübergehend auf Eis aufbewahrt.

Jeder Probe wurde dann 1 ml eisgekühlte 120 mM KNO_3 zugesetzt, bevor sie, in einen Exsikkator übergeführt, 2-mal evakuiert und anschließend mit N_2 belüftet wurden. Nach dem Verschließen der Probenflaschen wurde ein Teil der Proben sofort auf einem Wasserbad gekocht (Blindwert), während die restlichen Proben 30 min auf einem abgedunkelten Wasserbad bei 30°C geschüttelt wurden. Mit Ablauf dieser Inkubationszeit wurden auch die restlichen Proben 10 min gekocht, um jegliche Enzymaktivität zu stoppen.

¹ Inkubationspuffer

0,1M KH_2PO_4 mit KOH auf pH 7,5 eingestellt
3 % Propanol-1 (v / v)

Von den aufgekochten Proben wurde je 1 ml entnommen, mit 1 ml Sulfanilamid (1 g in 100 ml 1 N HCl gelöst) versetzt und kurz geschüttelt. Etwa 5 min später wurde jeder Probe 1 ml N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin-Dihydrochlorid (0,2 g in 100 ml aqua bidest.) zugesetzt und erneut geschüttelt. Der dabei gebildete rotviolette Azofarbstoff kann äußerst empfindlich gemessen werden und ist proportional der Nitritkonzentration in der Probe (**Hageman**, 1980). Da die Azokopplung eine Gleichgewichtsreaktion ist, konnte die photometrische Bestimmung erst nach etwa 30 min erfolgen.

Zur photometrischen Bestimmung der Nitritgehalte wurde ein Mehrkanal-Photometer (Firma Perkin-Elmer, Modell LAMDA 2) eingesetzt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 540 nm. Nach Abzug der Blindwerte ließ sich die Enzymaktivität in $\mu\text{Mol umgesetztes Nitrat} / \text{g FM h}^{-1}$ errechnen.

3.4.2 In vitro Nitratreduktasetest

Der *in vitro* NRA-Test dient als Maß für die maximal mögliche Umsetzung von Nitrat zu Nitrit in der Pflanze. Da bei diesem Test das Pflanzenmaterial homogenisiert wird, ist die Einführung von Chemikalien unabdingbar, die beispielsweise die Inaktivierung von Enzymen durch phenolische Substanzen unterbinden können. Die in dieser Arbeit für den *in vitro* NRA-Test verwendeten Reagenzien und Reaktionsbedingungen wurden auf der Basis der Arbeiten von **Scholl** et al. (1974), **Hageman** et al. (1980), **Kuo** et al. (1982), **Wallace** (1986) und **Long** et al. (1990) zusammengestellt.

Bei der Ernte wurden die Pflanzen in Blatt, Sprossachse und Wurzel getrennt, wobei auch hier die Wurzeln sehr sorgfältig abgespült und vorsichtig abgetrocknet wurden. In einem mit Eis vorgekühlten Mörser wurden daraufhin ca. 0,5 - 1,5 g frischen Pflanzenmaterials mit flüssigem Stickstoff versetzt und gründlich zerkleinert. In kleinen Portionen (5 ml) wurde der auf 4°C gekühlte **Extraktionspuffer**² zugesetzt und solange weiter gerührt, bis eine homogene Lösung vorlag. Diese Lösung wurde in

² Extraktionspuffer (100 ml)

1 g Casein	50 ml Tris-HCl pH 8,5
2,5 g Polyclar AT	5 ml K ₂ HPO ₄
0,8296 mg FAD	5 ml EDTA
0,4936 mg Leupeptin 10 μM	1 ml Na ₂ MoO ₄
15,42 mg DTT (Dithiothreitol, 1 mM)	

Zentrifugengläser übergeführt und 20 min bei 2°C mit 15.000 U min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und auf Eis aufbewahrt (Rohextrakt).

In Reagenzgläsern wurden 1,9 ml **Probenpuffer**³ vorgelegt, mit 0,1 ml Rohextrakt versetzt und anschließend auf dem Wasserbad bei 30°C geschüttelt. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 0,1 M Zinkacetat gestoppt. Den Proben, die zur Bestimmung der zu Testbeginn im Gewebe vorhandenen Nitritkonzentration dienen (Blindwerte), wurde bereits vor der Inkubation auf dem Wasserbad 0,1 ml Zinkacetat zugesetzt, um das Enzym auszufällen und so die Enzymaktivität auszuschalten.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 2°C mit ca. 10.000 U min⁻¹) wurde der Überstand in frische Reagenzgläser überführt, zur Klärung der Proben mit 30 µl 1 mM Phenazinmethosulfat versetzt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte wie beim *in vivo*-Test (3.4.1) über die Bildung des Azofarbstoffes und anschließender photometrischer Auswertung.

3.5 Nitratextraktion

Zur Bestimmung der Nitratgehalte in verschiedenen Pflanzenorganen wurde frisches Pflanzenmaterial in Plastikgläschen gebracht und bei -20°C eingefroren. Nach wenigen Tagen wurden die Proben aus der Kühltruhe entnommen und in einer Gefriertrocknung (Dura-Top Bulk Tray Dryer, FTS Systems) schonend bei -18°C getrocknet. Diese Proben wurden dann in einer Kugelmühle zu feinem Pulver zermahlen, in frische Probengläser gefüllt und im Exsikkator aufbewahrt.

Die Bestimmung des extrahierbaren Nitratgehaltes in Pflanzengewebe erfolgte in Anlehnung an die Methode von **Cataldo** (1975). Es wurden 50 bis 150 mg des gemahlten Pflanzenmaterials in Zentrifugengläser eingewogen und mit 7 ml aqua dest. versetzt. Die Lösungen wurden daraufhin 30 min auf dem Wasserbad gekocht, wobei in 2 Portionen nochmals 3 ml aqua dest. zugegeben und an den Glaswänden anhaftendes Pflanzenmaterial in die siedende Lösung gespült wurde. Nachdem die

³ Probenpuffer

0,8 µM NADH₂

20 µM KNO₃

50 µM KH₂PO₄ mit KOH auf pH 7,5 eingestellt

Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie 10 min mit 8000 U min^{-1} bei 4°C zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge, Model J2-21), um die Pflanzenteile zu sedimentieren. Anschließend wurden die Zentrifugengläser zurückgewogen und mit ParafilmTM verschlossen.

Vom klaren Überstand wurden 0,2 ml abpipettiert und in große Reagenzgläser übergeführt. Vorsichtig wurden 0,8 ml 5 % Salicylsäure (w / v) in konzentrierter H_2SO_4 zu dem Extrakt zugegeben und die Proben vorsichtig durchmischt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurden unter ständigem Durchmischen 15 ml 4 N NaOH in kleinen Portionen hinzugegeben. Die bei der Umsetzung von Nitrat mit Salicylsäure entstandene Nitrosalicylsäure wird durch das Anheben des pH-Werts auf 12-13 in die dissoziierte Form übergeführt, die eine gelbe bis orangerote Färbung besitzt. Extrakte, die zu einer roten Färbung führen, enthalten hohe Nitratkonzentrationen, bei denen das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht mehr gilt. Bei solchen Lösungen wurden die Rohextrakte in einer stärkeren Verdünnung mit der Salicylsäure versetzt und erneut analysiert.

Die Bestimmung der Nitrosalicylsäure erfolgte nach dem Abkühlen der Proben am Photometer (UV / VIS Spectrometer Lambda 2, Perkin Elmer) bei 412 nm. Als Standard dienten Nitrat-Eichlösungen, die anstelle des Extraktes mit der schwefelsauren Salicylsäure versetzt wurden.

3.6 Produktion und Einsatz des kurzlebigen ^{13}N

Der Positronenstrahler ^{13}N wurde im Institut für Nuklearchemie (INC) der Forschungszentrum Jülich GmbH mit Hilfe eines Baby Zyklotrons (Model BC 1710, Japan Steel Works Ltd.) hergestellt. In Abbildung 2 ist dieser Vorgang schematisch dargestellt.

Durch Beschuss von 1 bis 2 ml dreifach destilliertem Wasser mit einem Protonenstrahl (17 MeV) entsteht in einer $^{16}\text{O}(p,\alpha)$ Reaktion aus dem Sauerstoff das kurzlebige Stickstoffisotop ^{13}N . Beim Beschuss des Wasser-Targets mit energiereichen Protonen (1_1p) wird das Sauerstoffatom des Wassers angeregt und es finden die in Tabelle 4 (Gleichung 7 und Gleichung 8) dargestellten Umwandlungen statt.

Entsprechend der Isotopenverteilung der natürlich vorkommenden stabilen Sauerstoffisotope ^{16}O (99,7 %) und ^{18}O (0,2 %) entsteht beim Beschuss neben ^{13}N auch ein geringer Anteil ^{18}F . Die freigesetzten α - Teilchen (^4_2He) und Neutronen (1_0n)

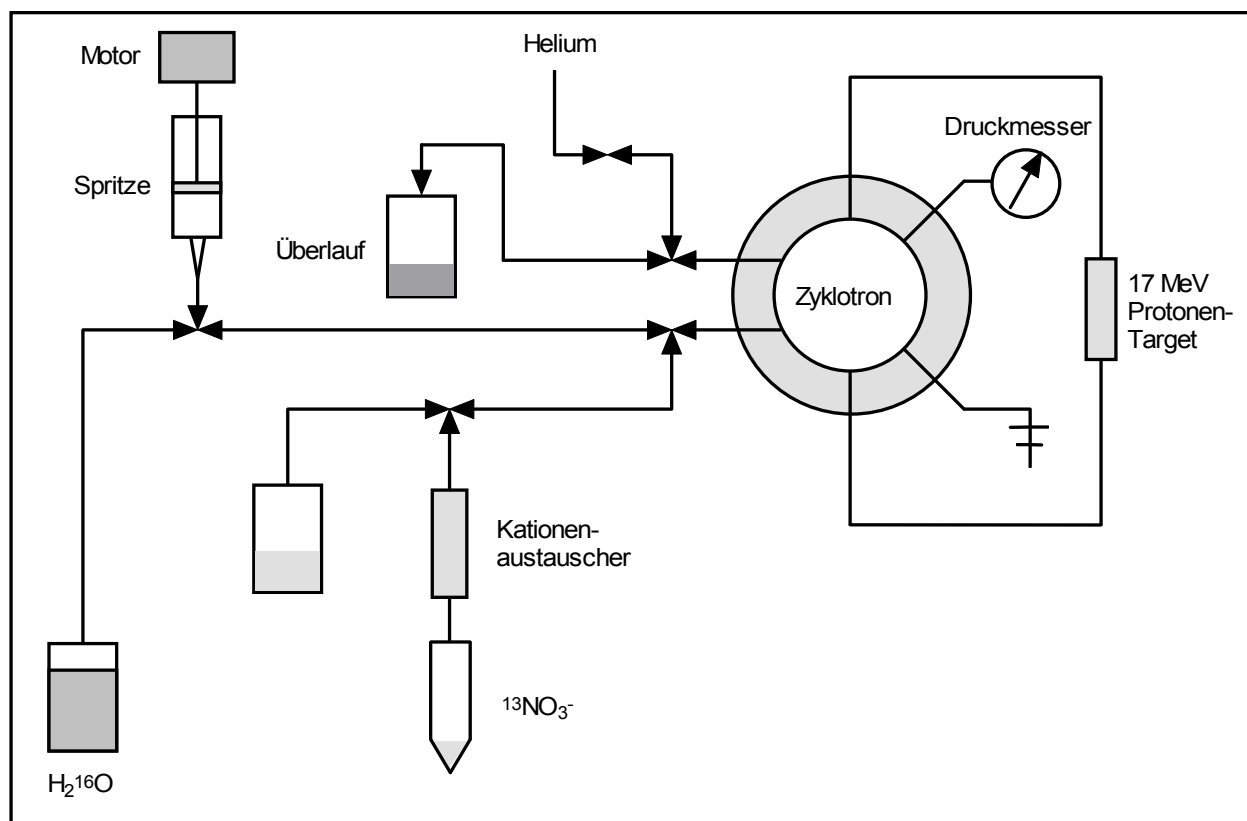


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der ferngesteuerten Beladung und Entladung des Zyklotrons zur Produktion des Stickstoffisotops ^{13}N aus einem Wasser-Target (nach **Wieneke** und **Nebeling**, 1990).

sind für die Reaktion nicht von Bedeutung, machen aber eine gute Abschirmung der Produktionsstätte erforderlich.

Die erzeugten Isotope sind nicht stabil, sondern zerfallen unter Aussendung eines Positrons (β^+) nach Gleichung 9 und Gleichung 10 (Tabelle 4).

Das Positron hat in Lösungen oder Festkörpern nur eine geringe Reichweite und trifft sehr schnell auf ein Elektron. In einer Materie - Antimaterie Reaktion werden beide Teilchen unter Aussendung von 2 γ - Quanten mit einer Energie von je 511 keV vernichtet (Tabelle 4, Gleichung 11).

Die Tatsache, dass die γ - Quanten in einem Winkel von 180° auseinanderstreben, kann man sich in einer Koinzidenzschtung zunutze machen, um den Ort des Zerfalls zu lokalisieren. Zu diesem Zweck werden Detektoren zu beiden Seiten des zu untersuchenden Objekts so ausgerichtet, dass sie denselben Raum erfassen können. Während der Messung werden dann nur die Messereignisse gezählt, die an den aufeinander ausgerichteten Detektoren zum gleichen Zeitpunkt erfasst wurden. So lässt sich trotz der Streuung der Strahlung ermitteln, ob und welche Menge des radioaktiven Tracers einen bestimmten Bereich des untersuchten Objekts erreicht hat. Die PET-Technik (Positronen-Emissions-Tomographie) wird vorwiegend in der Medizin genutzt, um beispielsweise die Versorgung bestimmter Gehirnbereiche mit markierten Zuckern zu bestimmen (**Heiss** et al., 1985; **Wienhard** et al., 1989).

Tabelle 4 : Reaktionsgleichungen zur Produktion von ^{13}N aus einem Wasser-Target und zum anschließenden Zerfall der entstandenen Isotope.

	Reaktion
Gleichung 7	$^{16}_8\text{O} + ^1_1\text{p} \xrightarrow{17\text{MeV}} ^{13}_7\text{N} + ^4_2\alpha$
Gleichung 8	$^{18}_8\text{O} + ^1_1\text{p} \xrightarrow{17\text{MeV}} ^{18}_9\text{F} + ^1_0\text{n}$
Gleichung 9	$^{13}_7\text{N} \xrightarrow{9,97\text{min}} ^{13}_6\text{C} + \beta^+$
Gleichung 10	$^{18}_9\text{F} \xrightarrow{109,8\text{min}} ^{18}_8\text{O} + \beta^+$
Gleichung 11	$\beta^+ + \beta^- \longrightarrow 2\gamma^{(511\text{keV})}$

3.6.1 Aufbereitung des $^{13}\text{NO}_3^-$

Nach einer Bestrahlzeit von etwa 5 min wird die ^{13}N -Probe mit Heliumgas durch Polyethylenrohre in eine Bleibox gepresst. Um bei der Nitrataufnahme störende Kationen wie beispielsweise $^{13}\text{NH}_4^+$ zu entfernen, wird die wässrige Lösung über einen Kationenaustauscher (Dowex 50x8) geleitet und die austretende Lösung gesammelt. In der Regel konnten so 3 bis 4 GBq radioaktiver Tracer gewonnen werden. Die so vorbehandelte Probe wurde von der Produktionsstätte zum pflanzenphysiologischen Labor transportiert.

Neben dem benötigten $^{13}\text{NO}_3^-$ sind aber noch Spuren von $^{13}\text{NO}_2^-$ und $^{18}\text{F}^-$ in der Probe, die abgetrennt werden müssen (Lee et al., 1986). Beide Stoffe müssen weniger wegen ihres Einflusses auf die Pflanze, sondern vielmehr aus messtechnischen Gründen entfernt werden. Der chemische Einfluss dieser Verunreinigungen auf die Nitrataufnahme ist als gering einzuschätzen, da bei der Produktion des Tracers eine nahezu „trägerfreie„ Lösung entsteht. Diese Bezeichnung rührt daher, dass bei der Tracerproduktion so geringe Mengen des Isotops erzeugt werden, dass sie mit chemischen Methoden kaum nachweisbar sind.

Das Entfernen von $^{18}\text{F}^-$, das wie ^{13}N ein Positronenstrahler ist, ist von besonderer Bedeutung, da dieses Isotop mit 109,8 Minuten eine wesentlich längere Halbwertszeit als ^{13}N besitzt. Als Positronenstrahler besitzen beide Isotope dasselbe Energiespektrum, so dass sie am Szintillationszähler nicht voneinander getrennt werden können. Bei der für die Auswertung nötigen Zerfallskorrektur der Messdaten könnten sich ansonsten beträchtliche Fehler ergeben. Abhilfe schafft eine SEPAK alumina N Säule, die erst mit 10 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ konditioniert und dann mit destilliertem Wasser gespült wird. Die radioaktive Tracerlösung wird dann auf die Säule aufgebracht und in einem geschlossenen System mehrmals über diese Säule gepumpt. In regelmäßigen Abständen wird die Qualität der Säule mittels eines Radio-HPLC-Systems überprüft.

Nach der Abtrennung des $^{18}\text{F}^-$ wird die radioaktive Lösung unter dem Abzug mit 10 % H_2SO_4 versetzt und kurz aufgeköcht. Bei diesem Vorgang wird salpetrige Säure und $^{13}\text{NO}_2^-$ zerstört und als NO_x ausgetrieben. So ist gewährleistet, dass kein markiertes Nitrit in die Nährlösung gelangt und aufgrund seiner geringeren Aufnahme die Messung der Nitrataufnahme verfälscht.

Nach dem Aufkochen wird die Lösung mit NaHCO_3 neutralisiert. Jetzt kann ein Aliquot

dieser Lösung in vorbereitete Nährlösungen pipettiert und ein Versuch zur $^{13}\text{NO}_3^-$ Aufnahme gestartet werden.

3.6.2 Anwendung von $^{13}\text{NO}_3^-$ bei der Nitrataufnahme

Das Isotop ^{13}N wurde bei Versuchen eingesetzt, deren Ziel es war, neben der Nettoaufnahme auch den Nitratinflux und die Verlagerung in der Pflanze zu bestimmen. Im Rahmen von Versuchen zur Induktion der Nitrataufnahme wurde so aus dem Influx und der photometrisch bestimmten Nettoaufnahme auch der NO_3^- -Efflux aus den Wurzeln bestimmt.

Für Influx- / Efflux-Studien wurde die in Abbildung 3 dargestellte Messapparatur verwendet. In einem Durchfluss-System wurde Nährlösung vorgelegt und mit 0,5 - 2 ml des aufbereiteten $^{13}\text{NO}_3^-$ versetzt. Nach gutem Durchmischen wurden die Versuchspflanzen auf die Durchfluss-Apparatur gesetzt und die Messung gestartet.

Am Photometer wurde die Extinktion der Nährlösung bei 210 nm und 250 nm aufgezeichnet (Netto-Aufnahme), während die Detektoren die Abnahme der γ - Strahlung registrierten. Nach Zerfallskorrektur der Messwerte konnte so der Influx kontinuierlich gemessen werden. Nach 10 - 15 min wurden die Pflanzen geerntet, die Wurzeln mit 0,5 mM CaSO_4 abgespült und vorsichtig abgetrocknet.

Die Pflanzenproben wurden danach in Szintillationsvials überführt, gewogen und anschließend in einem Gamma-Spektrometer (Packard, Modell 5650) mit einem Messfenster von 460-560 keV gemessen. Der typische 511 keV-Peak des β^+ -Zerfalls (Tabelle 4, Gleichung 11) lag somit genau im Messfenster. Alle Proben wurden für je 1 min gemessen. Die Probenserie wurde insgesamt dreimal vermessen.

Für die Versuchsauswertung wurden die Messwerte aufgrund der kurzen Halbwertszeit korrigiert und danach wurde berechnet, welcher Anteil des ^{13}N während der Markierung in die verschiedenen Pflanzenfraktionen gelangt war.

Neben den Fluxversuchen wurde $^{13}\text{NO}_3^-$ auch zur Aufnahme von Zeitreihen zur Verlagerung von ^{13}N eingesetzt. Der Nährlösung wurde bei diesen Versuchen zusätzlich 1 mM des Puffers MES zugesetzt. So konnten Effekte ausgeschlossen werden, die durch die Verschiebung des pH-Wertes während der Dauer der Markierung eine Veränderung der Nitrataufnahme verursachen können.

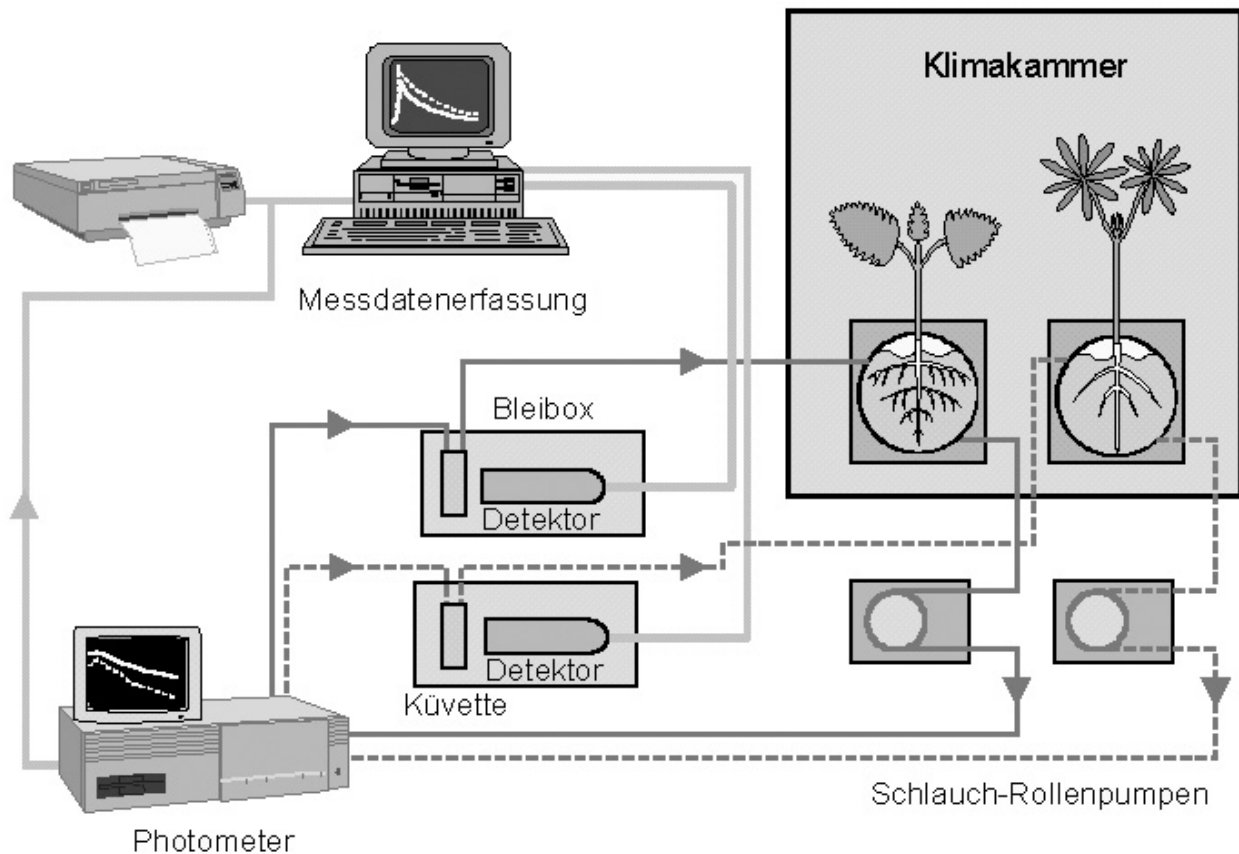


Abbildung 3: Darstellung der Messapparatur zur Durchfluss-Messung von Nitrat an Pflanzen. Die Nährlösung wird von den Markierungsgefäßen über Pumpen zum Photometer geleitet, wo aus der Absorption bei 210 nm und 250 nm der Nitratgehalt berechnet wird. Vom Photometer wird die Nährlösung an Detektoren (Bismuth-Germanat Detektor mit Vorverstärker) vorbeigeleitet, bevor sie wieder in die Markierungsgefäße gelangt. Von den an eine Hochspannungsquelle angeschlossenen Detektoren werden die Messsignale über einen Messverstärker an einen Mehrkanal-Zähler weitergeleitet. Die Daten gelangen schließlich in den PC, wo sie über eine Computer-Steckkarte (Canberra System S 100) umgewandelt und gespeichert werden (modifiziert nach **Wieneke** und **Nebeling**, 1990).

3.7 $^{11}\text{CO}_2$ und $^{14}\text{CO}_2$ bei Untersuchungen zum Assimilattransport

In der Nuklearmedizin dient $^{11}\text{CO}_2$ als Grundsubstanz zur Synthese von längerketigen C-Molekülen, die zur Diagnostik und für pharmakokinetische Studien eingesetzt werden (Stöcklin, 1988). In der Pflanzenphysiologie kann $^{11}\text{CO}_2$ ohne weitere Umwandlung eingesetzt werden, um die CO_2 -Aufnahme und den Assimilattransport zu verfolgen (Roeb et al, 1986^a und 1986^b).

3.7.1 Produktion des kurzlebigen $^{11}\text{CO}_2$

Genauso wie bei ^{13}N handelt es sich auch bei ^{11}C um einen Positronenstrahler. Das Radioisotop ^{11}C wurde im Institut für Nuklearchemie durch Protonenbeschuss von Stickstoffgas hergestellt. Die Umsetzung erfolgte nach einer $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ Reaktion. Da

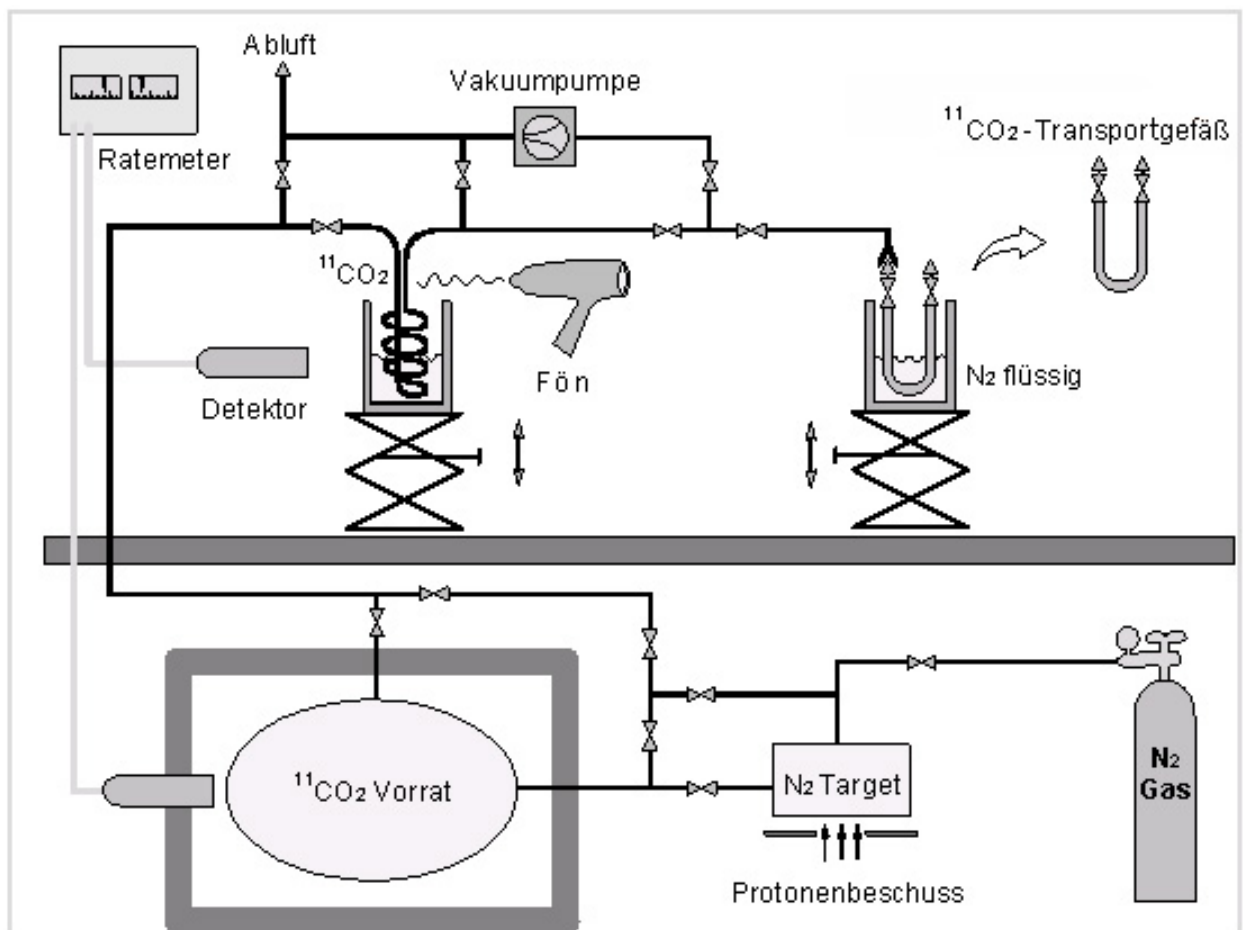


Abbildung 4: Produktion von $^{11}\text{CO}_2$. Durch Beschuss eines N_2 -Targets (Zyklotron) mit energiereichen Protonen entsteht das kurzlebige $^{11}\text{CO}_2$, das in einem Vorratstank gespeichert wird. Aus diesem Vorrat wird das $^{11}\text{CO}_2$ in die Sammelapparatur geleitet, wo es ausgefroren und in ein Transportgefäß übertragen wird (nach Keutgen, 1993).

das verwendete N_2 -Gas in geringen Mengen Sauerstoff enthält, kann sich das entstehende ^{11}C mit dem O_2 zu $^{11}\text{CO}_2$ (98 %) und ^{11}CO (2 %) verbinden. Die Halbwertszeit von ^{11}C beträgt 20,4 min.

Über Gasleitungen wird das für einen Versuch benötigte $^{11}\text{CO}_2$ von einem Vorratstank in der Nähe des Zyklotrons zum Photosyntheselabor geleitet (Abbildung 4). Dort wird das $^{11}\text{CO}_2$ beim Durchströmen einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Rohrschleife ausgefroren. Die angereicherte ^{11}C -Aktivität wird über einen Detektor gemessen und auf einem Ratemeter angezeigt. Das in der Rohrschleife gesammelte $^{11}\text{CO}_2$ wird anschließend erwärmt und in das mit flüssigem N_2 gekühlte Transportgefäß geleitet, wo es erneut ausgefroren wird. Das mit $^{11}\text{CO}_2$ beladene Transportgefäß wird dann von der Sammelapparatur zur Applikationsanlage gebracht, wo das $^{11}\text{CO}_2$ entweder für Pulsversuche oder kontinuierliche Markierungsversuche eingesetzt werden kann.

3.7.2 Kontinuierliche $^{11}\text{CO}_2$ Applikation

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden Rapspflanzen in der Klimakammer des Messlabors in ein geschlossenes System aus Blattküvette und zirkulierender Nährlösung gebracht. Die Blattküvette war an eine Gaswechselapparatur angeschlossen, in der während des Versuches Temperatur, Feuchte und Lichtintensität eingestellt und kontrolliert werden konnten. In der Regel wurden 2 Pflanzensets, bestehend aus 2 bis 3 Einzelpflanzen, gleichzeitig mit $^{11}\text{CO}_2$ versorgt. Durch einen Differenz-Infrarotgasanalysator wurde abwechselnd die CO_2 -Differenz zwischen Eingang und Ausgang der beiden Blattküvetten gemessen und an einen Rechner weitergeleitet. Aus der CO_2 -Nettoaufnahme wurde später die apparente Photosynthese errechnet.

Die $^{11}\text{CO}_2$ -Konzentration im Gaskreislauf wird während der Applikation über reglergesteuerte Pumpen reguliert (Abbildung 5). Dabei wird radioaktives $^{11}\text{CO}_2$ zunächst vom $^{11}\text{CO}_2$ -Eingabekreislauf in den $^{11}\text{CO}_2$ -Zwischenkreislauf gepumpt, bevor es in den $^{11}\text{CO}_2$ -Pflanzenkreislauf gelangen kann. Durch Regulierung der Zudosierung von inaktivem CO_2 wird der CO_2 -Gehalt im Pflanzenkreislauf auf 350 ppm gehalten. Die mit 20,4 min recht kurze Halbwertszeit des ^{11}C bedingt, dass bei der kontinuierlichen Applikation das $^{11}\text{CO}_2$ im Eingabekreislauf etwa alle 2 h aus dem Reservoir $^{11}\text{CO}_2$ aufgefüllt werden muss. Nach 3 bis 4 Stunden ist aber auch der Vorrat im $^{11}\text{CO}_2$ Reservoir erschöpft und muss durch eine neue Produktion aufgefüllt werden. Beim

Beenden der Applikation wird die Luft aus dem Pflanzenkreislauf über eine NaOH-Waschflasche ausgeblasen und durch Luft aus der Umgebung ersetzt.

Als Positronenstrahler zerfällt ^{11}C in einer $^{11}\text{C}(\beta^+)^{11}\text{B}$ Reaktion in das Element Bor. Die Positronen (β^+) haben nur eine geringe Reichweite und reagieren mit den Elektronen der Materie, die sie durchdringen. Wie beim Zerfall von ^{13}N (Gleichung 11, S.27) entstehen beim Zusammentreffen von Positron und Elektron 2 γ -Quanten mit einer Energie von 511 keV, die Pflanzengewebe und die Blatt- oder Wurzelküvette ohne Abschwächung durchdringen und von NaJ-Szintillationsdetektoren gemessen werden. Das Signal wird über Vorverstärker (Preamplifier) und Verstärker (Amplifier) verstärkt und über ein Vielkanalspektrometer (Multi channel analyzer) einer Sechzehnkanalzähleinrichtung (SKZE) zugeleitet. Am Versuchsende werden die Daten dann auf einen Rechner übertragen.

Ein großer Vorteil der ^{11}C -Technik ist, dass wiederholt Versuche mit der gleichen Fragestellung an derselben intakten Pflanze durchgeführt werden können. Dabei ist es

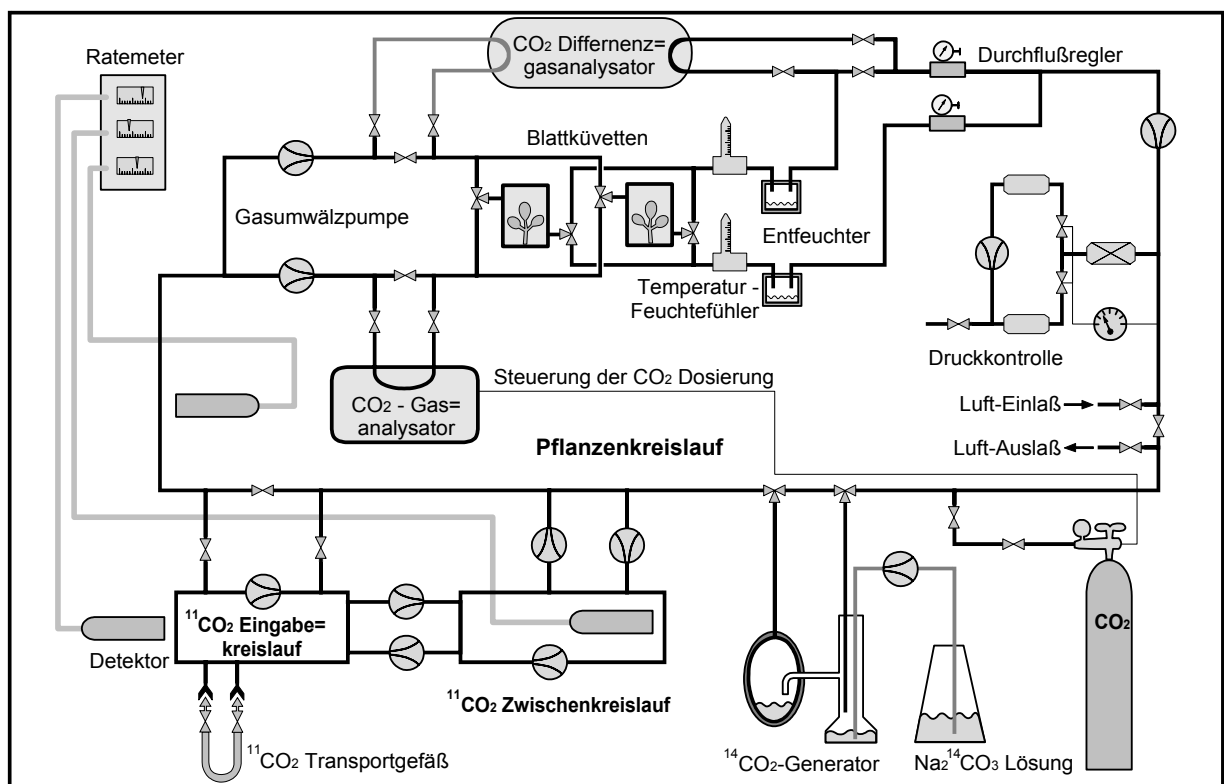


Abbildung 5: In der Gaswechselapparatur können für Photosynthesestudien $^{11}\text{CO}_2$ und / oder $^{14}\text{CO}_2$ in einem Pulsexperiment oder kontinuierlich appliziert werden. Über zahlreiche Mess- und Regulationseinrichtungen kann die $^{11}\text{CO}_2$ -Konzentration bei Bedarf konstant gehalten werden (modifiziert nach **Keutgen**, 1993).

möglich, mit gleichen oder unterschiedlichen Versuchsparametern Informationen zu gewinnen, die sonst nur durch eine große Zahl von Einzeluntersuchungen unter Berücksichtigung der pflanzlichen Variabilität zu ermitteln wären. Für dynamische Prozesse, wie die Verlagerung von Assimilaten, bietet sich zudem die Möglichkeit, den Einfluss von Störfaktoren auf diese Vorgänge *in vivo* zu verfolgen.

3.7.3 $^{14}\text{CO}_2$ Applikation und ^{14}C -Messung

Mit der im vorhergehenden Absatz beschriebenen Applikationsanlage kann den Versuchspflanzen neben dem kurzlebigen $^{11}\text{CO}_2$ auch $^{14}\text{CO}_2$ angeboten werden. Hierzu werden über eine Schlauchrollenpumpe wenige ml einer $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ -Lösung zu einer Säurevorlage (10 % H_3PO_4) gegeben. Aus diesem CO_2 -Generator wird unter Kontrolle der CO_2 -Konzentration im Pflanzenkreislauf mit Hilfe eines Infrarot-Gasanalyzers das $^{14}\text{CO}_2$ zudosiert (Abbildung 5).

Die Applikation erstreckte sich in der Regel über 60 bis 90 min und erfolgte im Entwicklungsstadium EC 15 (1.Laubblatt-Stadium). Die pro Versuch eingesetzte Aktivität lag zwischen 5 und 40 kBq ^{14}C . Ziel der Puls-Experimente war es, Aussagen über die Verlagerung des aufgenommenen CO_2 im Laufe der Zeit und die Abgabe des eingebauten ^{14}C durch Prozesse wie Wurzelatmung und Respiration zu sammeln. Von Interesse war dabei vor allem der Einfluss der N-Ernährung auf die Assimilatverteilung und die Verlagerung der Photosyntheseprodukte in der Pflanze. Weiterhin wurde die Bedeutung von Kalium beim Zusammenspiel zwischen N-Aufnahme und C-Assimilation betrachtet.

Die Pflanzen wurden 2 bis 3 Tage nach der Applikation geerntet und hatten zu diesem Zeitpunkt das Entwicklungsstadium EC 17 (2.Laubblatt-Stadium) erreicht. Bei der Ernte wurden die Pflanzen in die Fraktionen Blätter, Sprossachse und Wurzel aufgeteilt. Die Fraktionen wurden ausgewogen und dann bei -20°C eingefroren. Nach dem Trocknen in der Gefriertrocknung bei -18°C wurden die Proben gemahlen und zur Bestimmung des ^{14}C -Gehaltes in den einzelnen Fraktionen mit einem Oxidizer (Tri-Carb Packard Oxidizer, Modell 306) verascht. Die Bestimmung der ^{14}C -Gehalte wurde an einem Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer (TriCarb 2500 TR, Packard) vorgenommen.

3.7.4 Photorespiration, Dunkelrespiration und Wurzelatmung

Für eine spätere Bilanzierung des aufgenommenen $^{14}\text{CO}_2$ war es nötig, Prozesse einzubeziehen, die zu einer Abgabe von ^{14}C -Verbindungen führen können. Als erstes ist hier die Photorespiration zu nennen, die in denselben Geweben wie die Photosynthese abläuft, jedoch zu einer CO_2 -Abgabe führt. Da die Markierung der Versuchspflanzen in einem geschlossenen System erfolgte (Abbildung 5), stand von den Blättern abgegebenes $^{14}\text{CO}_2$ jedoch der Pflanze wieder zur Aufnahme zur Verfügung. Während der 1 bis 1,5 stündigen Puls-Markierung mit $^{14}\text{CO}_2$ wurden über 99,8 % der angebotenen ^{14}C -Aktivität aufgenommen. Einen Anhaltspunkt für die Photorespiration

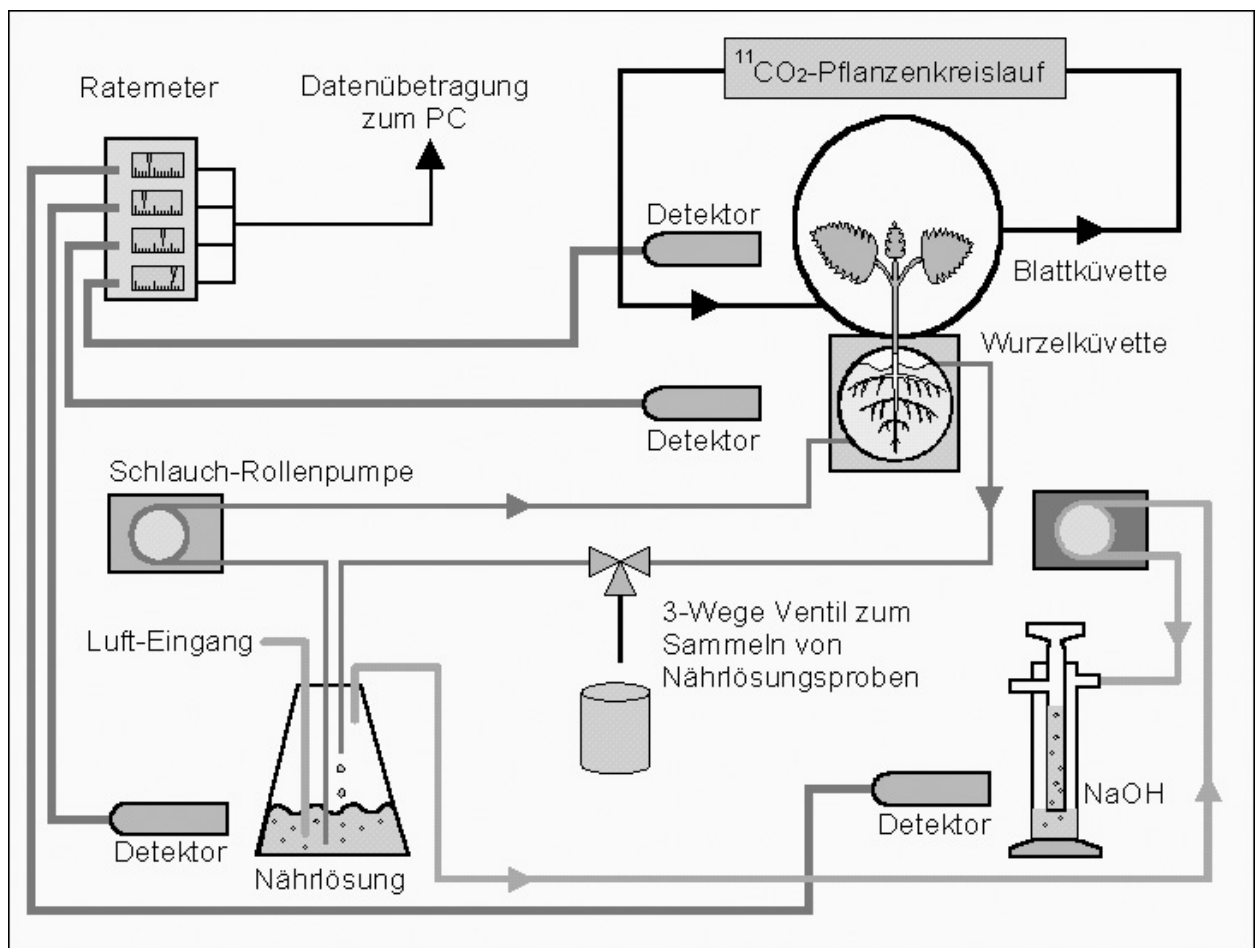


Abbildung 6: Verlagerung von Assimilaten vom Spross in die Wurzel. Die Blattkuvette ist an die $^{11}\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ -Applikationsanlage (Abbildung 5) angeschlossen. Es werden Temperatur, Feuchte und CO_2 -Gehalt am Eingang und am Ausgang der Kuvette gemessen. Die Detektoren erfassen die Verlagerung von ^{11}C in der Pflanze und das Freisetzen von markierten Abbauprodukten in die Nährlösung. Der Nährlösungsvorrat wird mit Luft durchperlt und die Abluft durch eine Waschflasche mit NaOH geleitet. Gleichzeitig können über ein 3-Wege Ventil Nährlösungsproben gezogen werden.

gaben die ^{14}C -Gehalte in den NaOH-Waschflaschen, durch die am Ende der Lichtphase und am Versuchsende die Kammerluft ausgeblasen wurde.

In der Dunkelphase wurde der Pflanzengaskreislauf so geschaltet, dass Außenluft angesaugt, über die Pflanzen geleitet und erst nach der Passage von Waschflaschen, die mit 1 N NaOH gefüllt waren, wieder abgegeben wurde. Durch Dunkelrespiration aus ^{14}C -markierten Assimilaten freigesetztes $^{14}\text{CO}_2$ wurde somit aufgefangen und konnte quantitativ in einem Szintillationszähler bestimmt werden. Eine Wechsellautomatik ermöglichte dabei das Sammeln der abgegebenen Luft in Zeitintervallen, was eine Auflösung der Dunkelrespiration über die gesamte Dunkelphase ermöglichte.

Zur Bestimmung der Wurzelrespiration wurde der Nährlösungsvorrat mit Außenluft durchperlt und die Abluft durch eine NaOH-Waschflasche geleitet (Abbildung 6). Während der Lichtphase wurde die Waschflasche alle 2 h gewechselt, und in der Dunkelphase wurde die Abluft an eine Wechsellautomatik angeschlossen.

3.8 Gewinnung und Analyse von Xylemsaft

Zur Gewinnung von Xylemsaft sind vier verschiedene Methoden beschrieben worden. Bei der ersten Methode werden die Pflanzen in porösen Anzuchtgefäßen in Erde angezogen, in eine Druckkammer gebracht und dicht verschlossen. Nach dem Dekapitieren der Pflanzen wird ein konstanter Druck an den Wurzelraum angelegt, der eine gleichmäßige Gewinnung von Xylemsaft erlaubt (**Passioura**, 1990; **Jeschke** et al., 1990). Zur Gewinnung des Xylemsafts von Pflanzen, die in einem wässrigen Medium angezogen werden, kann diese Methode jedoch nicht verwendet werden.

Als gängige Methoden für Nährlösungskulturen haben sich das Aufsetzen von Glaskapillaren auf Schnittflächen an der Pflanze (**Engels** et al., 1992^b) und das direkte Sammeln von Blutungssaft (**Buysse** et al., 1994) bewährt. Um konstante Bedingungen für die Gewinnung von Xylemsaft von Pflanzen auf Nährlösungen zu schaffen, wird noch eine weitere Methode diskutiert. Auf die Sprossstümpfe von dekapitierten Pflanzen werden Glaskapillaren aufgesetzt, die über ein eisgekühltes Sammelgefäß mit einer Vakuumpumpe in Verbindung stehen (**Kim** et al., 1993; **Carrasso** et al., 1994). Aufgrund des geringen Durchmessers an der Wurzelbasis der Rapspflanzen erwies sich der Einsatz von Glaskapillaren als unpraktikabel. Es wurde stattdessen auf das Sammeln von Blutungssaft zurückgegriffen.

Die auf Nährlösung stehenden Pflanzen wurden mit einem scharfen Skalpell etwa 1 cm über der Wurzelbasis dekapitiert. Über die dekapitierten Pflanzen wurden Plastikboxen gestellt, in denen zuvor mit einem Zerstäuber destilliertes Wasser vernebelt wurde. So konnte ein Mikroklima mit etwa 95 % Luftfeuchte geschaffen werden, das die Gewinnung von Xylemsaft über eine längere Periode zuließ. Mit einer μl -Spritze (Hamilton) wurde in regelmäßigen Abständen der Blutungssaft von der Schnittstelle abgesaugt, in Eppendorf-Caps übergeführt und auf Eis gelagert. Am Ende der Sammelperiode wurden die Eppendorfgefäße gewogen und bei -20°C eingefroren, um eine Umsetzung der Inhaltsstoffe zu verhindern.

Die Analyse der Zusammensetzung des Xylemsafts erfolgte mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Firma Gynkotec, München). Um ein Einschleppen von Schwebeteilchen (Zellen und Zellteile, die beim Absaugen des Blutungssaftes mitgerissen wurden) in die HPLC-Anlage zu vermeiden, wurde der Xylemsaft nach dem Auftauen 5 min bei 5000 U min^{-1} zentrifugiert und so die Zellfraktion sedimentiert.

3.8.1 Nachweis von Anionen im Xylemsaft

Der Nachweis von Anionen im Xylemsaft wurde mit einer HPLC-Anlage mit Hilfe der Ionenchromatographie durchgeführt. Da die untersuchten Anionen - mit Ausnahme von Nitrat - keine charakteristischen Absorptionsspektren im sichtbaren Licht oder im UV-Bereich aufwiesen, wurde auf die Methode der indirekten UV-Spektroskopie zurückgegriffen. Bei dieser Methode macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die Konzentration des Laufmittels vor einem UV / VIS - Detektor immer dann absinkt, wenn eine Front gleicher Ionen den Detektor passiert. Dabei wird das UV-Signal des Eluenten abgeschwächt. Die Stärke der Abschwächung ist ein Maß für die Konzentration der jeweiligen Ionen.

Als Trennsäule diente die Anionenaustauschersäule RT Polyspher® IC AN-1 (Firma Merck, Länge 100 mm, Durchmesser 4.6 mm, Partikeldurchmesser $12 \mu\text{m}$). Um das Sorbens der Trennsäule vor Kontaminationen zu schützen, wurde eine Vorsäule (RT 10-4,6 Polyspher® IC AN-1, Merck) eingesetzt.

Von den zentrifugierten Xylemsaftproben wurden je $20 \mu\text{l}$ entnommen und mit $180 \mu\text{l}$ des Eluenten in Probenfläschchen pipettiert. Die Trennung der Proben erfolgte bei 20°C . Neben dem Aufbringen der Proben wurden auch Eichreihen für die Anionen

(NO_3^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}) aufgenommen, anhand derer später die Konzentrationen in den Xylemsaftproben errechnet wurden.

3.8.2 Nachweis der Kationen im Xylemsaft

Wie bereits bei der Bestimmung der Anionen wurde auch bei den Kationen die indirekte UV-Spektroskopie zum Nachweis von Kalium, Natrium, Magnesium und Calcium im Xylemexudat eingesetzt. Die Analyse der Kationen erfolgte mit der Kationenaustauschersäule PRP X-200 (Firma CS, Länge 250 mm, Durchmesser 4 mm, Partikeldurchmesser 5 μm). Als Vorsäule diente die Säule A-4 PRP X-200 (Firma CS).

Da sich die einwertigen und zweiwertigen Kationen nicht in einem Lauf trennen ließen, wurden zwei Eluenten verwendet. Für die zweiwertigen Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) wurde 0,2 mM Cer(III)-Nitrat als Eluent verwendet, während für die einwertigen Kationen eine Lösung aus 4 mM HNO_3 in 30 % Methanol / Wasser als Laufmittel diente.

In beiden Fällen wurden je 20 μl der zentrifugierten Proben mit 180 μl des Eluenten versetzt und bei 20°C auf der Säule getrennt. Die Bestimmung der Ionenkonzentrationen erfolgte anhand von Eichreihen, die mit Standardlösungen der untersuchten Kationen aufgenommen wurden.

3.9 AAS - Analytik

Zur Bestimmung der Kationen in den verschiedenen Pflanzenorganen wurde die Atomabsorptionsspektroskopie (Atomic Absorption Spectrophotometer 5100, Perkin Elmer) eingesetzt. Das frische Pflanzenmaterial musste dazu in der Gefriertrocknung bei -18°C getrocknet und anschließend fein gemahlen werden (vgl. 3.5 Nitratextraktion). In Glasgefäßen (Packard-Gläser) wurden daraufhin 20 bis 50 mg des Pulvers eingewogen und in einem Muffelofen bei einer Temperatur von 550°C verascht. Proben, die nach diesem Schritt noch nicht vollständig verascht waren, wurden 2 ml 1 N HCl zugesetzt und erneut in den Muffelofen gestellt. Die so vorbereiteten Pflanzenproben wurden dann mit 15 ml 0,5 N HNO_3 versetzt und auf dem Ultraschallbad in Lösung gebracht.

Von der salpetersauren Lösung wurden 5 ml abgenommen und in einen 50 ml Messkolben übergeführt. Nach Zugabe von 15 ml LaCl_3 (hergestellt durch Auflösen von 81,45 g La_2O_3 in 5 N HCl) wurde mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt und die Probe gut geschüttelt.

Am Atomabsorptionsspektrometer wurden dann die Gehalte von Calcium, Magnesium (Hohlkathodenlampe Ca-Mg 303-6092, Perkin Elmer), Natrium und Kalium (Hohlkathodenlampe Na-K 303-6095, Perkin Elmer) anhand einer Eichreihe bestimmt. Da sich bei der flammenphotometrischen Bestimmung Natrium und Kalium gegenseitig stören, wurde bei der Kaliumbestimmung der Probe ein Natriumstandard (1000 ppm) zugesetzt. Entsprechend erfolgte bei der Bestimmung der Natriumgehalte der Zusatz eines Kaliumstandards.

3.10 Aufnahme von Kalium und Influx von ^{86}Rb

Die Aufnahme von Kalium aus der Nährlösung wurde mit Hilfe der AAS-Analytik (siehe S.38) ermittelt. Aus der Differenz zwischen der Konzentration von K^+ in der Nährlösung zu Beginn bzw. am Ende eines Aufnahmeversuches wurde dann die Aufnahmerate errechnet.

Um die Verlagerung von K^+ zu ermitteln, wurde $^{86}\text{Rb}^+$ als Tracer für K^+ eingesetzt. Nach einer Markierungsdauer von 30 min wurden die Wurzeln der Versuchspflanzen 2-mal mit Nährlösung ohne $^{86}\text{Rb}^+$ abgespült und die Pflanze auf eine frische Nährlösung umgesetzt. Im Abstand von je 10 min wurden einzelne Pflanzen geerntet und in Blatt, Sprossachse und Wurzel getrennt. Diese Fraktionen wurden mit 0,1 M HNO_3 homogenisiert und anschließend 10 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Aus jeder Lösung wurde ein Aliquot entnommen, mit 10 ml Szintillator versetzt und in einem Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer (TriCarb 2500 TR, Packard) vermessen (Zaccheo et al., 1985).

Zur Bestimmung des Efflux von $^{86}\text{Rb}^+$ aus den Wurzeln der Pflanze wurde aus der Nährlösung eine Probe von 1 ml entnommen, mit 10 ml Szintillator versetzt und im Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer gemessen.

3.11 Malatbestimmung

Nach einer entsprechenden Probenvorbereitung bietet ein Enzymtest eine zuverlässige und genaue Methode, den Malatgehalt von Proben zu ermitteln. Bei dem hier verwendeten Enzymtest (Böhringer) wird von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass L-Äpfelsäure (L-Malat) in Gegenwart des Enzyms L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) unter Umsetzung von Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu Oxalacetat oxidiert wird.

Da das Gleichgewicht dieser Reaktion jedoch auf der Seite von L-Malat liegt, muss die Reaktion durch das Entfernen eines Produktes auf die rechte Seite verschoben werden. Dies erfolgt durch Zusatz von L-Glutamat und dem Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), das eine Aminogruppe von L-Glutamat auf das gebildete Oxoglutarat überträgt (Tabelle 5).

Die in diesen Reaktionen gebildete Menge $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ ist proportional zur Malatkonzentration und kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden (Tabelle 6).

Zur Bestimmung der Malatgehalte wurden die Pflanzen geerntet und in die Fraktionen Blatt, Sprossachse und Wurzeln aufgeteilt. Die Wurzeln wurden 2-mal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit Zellstofftüchern abgetrocknet.

An der Analysenwaage wurden daraufhin Portionen von 0,5 bis 2 g in Aluminiumfolie eingewogen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einem Mörser wurde das gefrorene Pflanzenmaterial dann mit etwas Quarzsand unter Zugabe von wenigen ml aqua dest. homogenisiert. Die Lösung wurde anschließend in große Reagenzgläser übergeführt, auf etwa 15 ml mit aqua dest. aufgefüllt und in ein Wasserbad gestellt. Dort wurden die Lösungen 20 min bei 60°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation im Wasserbad wurden die Lösungen filtriert, das Filtrat in Messkolben aufgefangen und mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Extrakt diente als Stammlösung für den nachfolgenden Enzymtest.

Es wurden 0,5 ml Probenpuffer (440 mg / l L-Glutaminsäure in Glycylglyzin-Puffer pH 10,0), 0,1 ml NAD^+ (210 mg NAD^+ Lyophilisat in 6 ml aqua dest.) und 5 µl Glutamat-

Tabelle 5: Reaktionsgleichungen bei der enzymatischen Bestimmung von L-Malat. Das Enzym Malatdehydrogenase (L-MDH) katalysiert die Umsetzung von L-Malat zu Oxalacetat (Gleichung 12). Durch Zusatz von L-Glutamat und dem Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) wird Oxalacetat aus dem Gleichgewicht aus Gleichung 12 entfernt und die Reaktion wird vollständig auf die rechte Seite verschoben. Am Photometer wird dann die gebildete Menge von $\text{NADH} + \text{H}^+$ bestimmt und daraus die ursprüngliche L-Malatkonzentration berechnet.

Gleichung 12

L-Malat + NAD^+



Gleichung 13

Oxalacetat + L-Glutamat



Oxalacetat-Transaminase (Böhringer) in einer ½ Mikroküvette vorgelegt und die Lösung gut durchmischt. Etwa 3 min nach Zugabe von 0,5 ml der verdünnten Probe (oder 0,5 ml Wasser für die Blindwertbestimmung) erfolgte die erste Messung am Photometer. Diese Extinktion (E_0) spiegelt den Leerwert wider, da bisher noch kein L-Malat umgesetzt werden konnte.

Mit der Zugabe von 5 µl L-Malat-Dehydrogenase (Böhringer) und gutem Durchmischen der Lösung wird die Umsetzung von Malat gestartet. Nach ca. 10 min ist die Reaktion beendet und es erfolgt eine zweite Messung am Photometer (E_1). Aus E_0 und E_1 ergibt sich die Extinktionsdifferenz ΔE , die in Gleichung 14 (Tabelle 6) eingesetzt wird.

Tabelle 6: Berechnung der Malatkonzentration (c) einer Pflanzenprobe, anhand der photometrisch bestimmten Extinktionsdifferenz (ΔE).

Gleichung 14
$$c = F \cdot \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \left[\frac{g}{l} \right]$$

c	=	L-Malat Konzentration der Probe in g l ⁻¹
F	=	Verdünnungsfaktor der Probe
V	=	Testvolumen (1,1 ml)
MG	=	Molmasse des Substrats L-Malat (134,09 g / Mol)
d	=	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
v	=	Volumen der Probe (0,5 ml)
ε	=	Extinktionskoeffizient von NADH+H ⁺ bei 340 nm (6,3 l mmol ⁻¹ cm ⁻¹)

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumskurven

4.1.1 Frischmassezunahme von *Brassica napus* cv. Liberator-00

Zur Bestimmung des Frischmassenzuwachses wurden aus den Anzuchtbecken täglich Pflanzen entnommen, in die Fraktionen Spross und Wurzel getrennt und gewogen. Die so von mehreren Anzuchtterminen mit identischen Kulturbedingungen erhaltenen Daten wurden zusammengetragen, gemittelt und zur Erstellung von Wachstumskurven benutzt. In Abbildung 7 ist die Wachstumskurve für Rapspflanzen dargestellt, die mit 100 μM Nitrat bei pH 5,6 unter einer Lichtperiode von 16 h angezogen wurden.

Wie aus Abbildung 7 zu entnehmen ist, steigt die absolute Schwankung der Frischmassen der Einzelpflanzen mit der Dauer der Anzucht an. Dies spiegelt jedoch nur die biologisch bedingte Variabilität der Wachstumsraten der Einzelpflanzen wider, denn die Standardabweichung belief sich bei allen Ernteterminen auf 18 % bis 22 % des jeweiligen Mittelwertes.

Zur Charakterisierung der Einflüsse von Nitrat und Kalium auf die Wachstumsraten von Raps wurden 4, 10, 17 und 24 d nach der Saat (0-3 Wochen nach Umsetzen auf Nährlösung) je 12 bis 16 Pflanzen entnommen und die Frischmassen bestimmt. Die

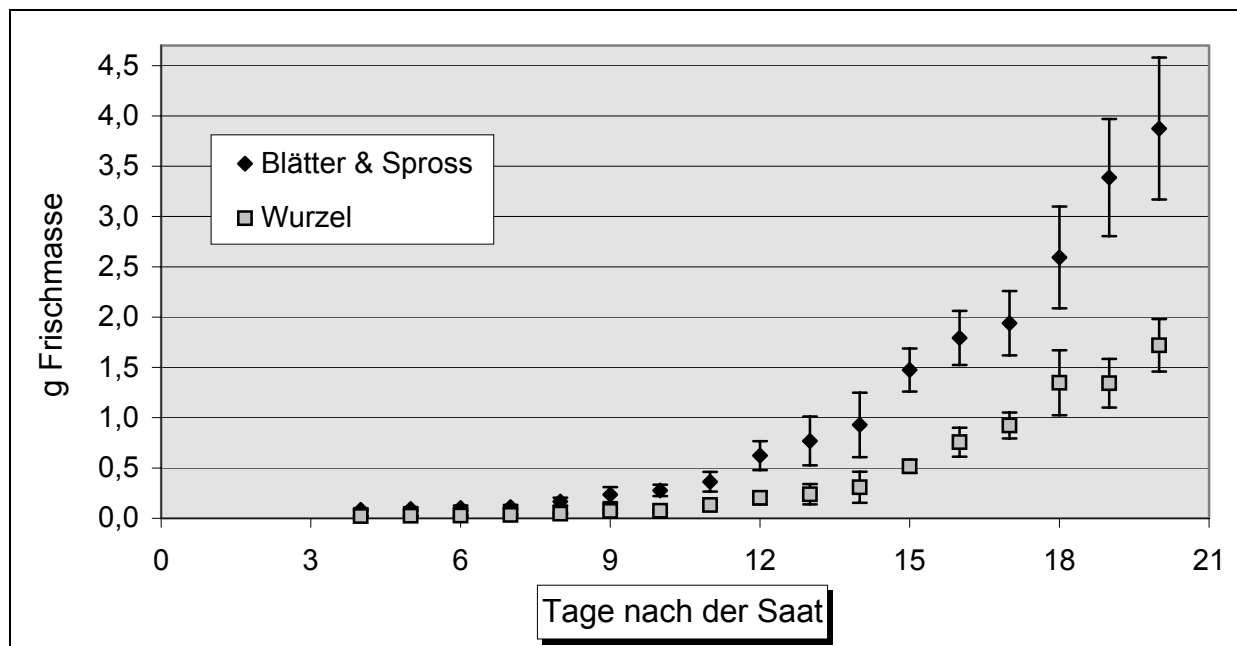


Abbildung 7: Zunahme der Frischmasse von Raps (*Brassica napus* L.) bei Anzucht mit 100 μM NO_3^- . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Messwerte von 16-24 Einzelpflanzen dar.

E r g e b n i s s e

Versuchsreihen wurden insgesamt 3-mal wiederholt, so dass zwischen 36 und 48 Einzelgewichte für jeden Zeitpunkt vorlagen. Die nach Tabelle 2 (S.19) aus den Tagesmittelwerten errechneten relativen Wachstumsraten sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Pflanzen der K-Mangelvarianten wurden in der ersten Woche noch mit 700 μM K^+ ernährt, um in diesem Zeitraum eine ungestörte Keimlingsentwicklung zu gewährleisten. Die Wachstumsraten der mit 200 μM Nitrat und 700 μM Kalium ernährten Variante wurden für eine statistische Auswertung als Bezugswerte gewählt. Signifikante Unterschiede wurden auf der Basis des 0,1 %, 1 % und 5 % Niveaus (t-Test) ermittelt. Während der Anzucht war unter allen Kulturbedingungen ein kontinuierliches Absinken der relativen Wachstumsraten von Spross und Wurzel zu beobachten (Tabelle 7). Dabei fiel auf, dass die Ammonium-Variante zwar anfänglich geringere Wachstumsraten als die Nitratvarianten zeigte, dies jedoch mit einer deutlich geringeren Abnahme der Wachstumsrate der Ammonium-Variante verbunden war. Ein signifikanter Unterschied in den Wachstumsraten bestand aus diesem Grund nur in den ersten 2 Wochen und wurde dann durch die deutlich geringere Abnahme der täglichen Zuwachsraten aufgehoben.

Die mit 2 mM Nitrat ernährten Pflanzen zeigten anfänglich die höchsten

Tabelle 7: Relative Wachstumsraten (RGR) von *Brassica napus* L. bei unterschiedlichen Anzuchtbedingungen. Die dunkel hervorgehobenen Wachstumsraten bzw. Wurzel/Spross-Verhältnisse zeigen einen signifikanten Unterschied (^a 0,1 %, ^b 1 %, ^c 5 % Niveau) zu den als Kontrolle geltenden Pflanzen der Anzucht mit 200 μM NO_3^- bei ausreichender Kaliumernährung.

Tage nach der Saat	RGR _{Spross}			RGR _{Wurzel}			Wurzel / Spross Verhältnis		
	10	17	24	10	17	24	10	17	24
100 μM NH_4^+ 700 μM K^+	0,244 ^a	0,234 ^c	0,224	0,265 ^a	0,250 ^c	0,234	0,353 ^b	0,394 ^b	0,421 ^b
100 μM NO_3^- 700 μM K^+	0,283	0,249	0,218	0,318	0,268	0,223	0,435	0,496	0,515
200 μM NO_3^-, 700 μM K^+	0,286	0,255	0,217	0,323	0,272	0,222	0,425	0,481	0,496
2000 μM NO_3^- 700 μM K^+	0,363 ^a	0,298 ^a	0,238 ^c	0,399 ^a	0,321 ^a	0,245 ^c	0,406	0,480	0,504
200 μM NO_3^- 0 μM K^+		0,233 ^b	0,186 ^a		0,257	0,208		0,507	0,593 ^b
200 μM NO_3^- 30 μM K^+		0,243	0,206		0,265	0,218		0,495	0,540
200 μM NO_3^- 100 μM K^+		0,251	0,215		0,271	0,223		0,485	0,515

Wachstumsraten. Hier war allerdings auch der größte Rückgang in den täglichen Zuwachsraten zu beobachten. Im Beobachtungszeitraum näherte sich so zwar die Zuwachsrate derjenigen der 200 μM -Variante an, doch bestand über die gesamte Versuchsdauer ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten.

Bei den K-Mangelvarianten zeigte sich, dass erst mit der 30 μM K-Variante Unterschiede zu den Wachstumsraten der vollwertig ernährten Pflanzen auftraten. Die Wachstumsraten lagen hier geringfügig unter denen der 100 μM -N Variante, wiesen aber noch keine signifikante Abweichung zur Kontrolle auf. Auf einen leichten Nährstoffmangel deutet die stärkere Abnahme der $\text{RGR}_{\text{Spross}}$ in der letzten Woche der Anzucht hin. Die Wachstumsraten des Sprosses der 0 μM K-Variante lagen schon in der ersten Woche auf dem Mangelmedium deutlich unter denen der 30 μM K-Variante, und die Differenz zwischen beiden Wachstumsraten nahm während der Anzucht weiter zu.

Bedingt durch die Tatsache, dass die Werte der $\text{RGR}_{\text{Wurzel}}$ stets über der $\text{RGR}_{\text{Spross}}$ lagen, stieg das Verhältnis von Wurzelmasse zu Sprossmasse unter den gewählten Versuchsbedingungen stetig an. Während zum Zeitpunkt des Umsetzens der Keimlinge auf die Nährlösung das Verhältnis Wurzel / Spross bei den Nitrat-Varianten noch bei $0,272 \pm 0,042$ lag, wurde bei der Ammonium-Variante zu diesem Zeitpunkt schon ein Wert von $0,297 \pm 0,056$ festgestellt. Wegen der langsamer verlaufenden Keimung der NH_4^+ -Variante (vgl. Anzuchtbedingungen S.17) waren diese Pflanzen beim Umsetzen auf Nährlösung 2-3 Tage älter als die Pflanzen mit NO_3^- -Ernährung.

Mit einem Wurzel / Spross-Verhältnis von 0,421 war am Ende des Untersuchungszeitraumes die Wurzelmasse der Ammonium-Variante am geringsten. Dies kann darauf hindeuten, dass diese Pflanzen ihren N-Bedarf bereits bei einer geringeren Wurzeloberfläche decken können und weniger Energie auf die Ausbildung von Wurzeln verwenden müssen.

Trotz der mit dem höheren Nitratangebot verbundenen erhöhten Wachstumsraten verlief das Wachstum von Wurzel und Spross in der 2 mM NO_3^- -Variante parallel zu dem der beiden anderen NO_3^- -Varianten.

Der Einfluss von Kalium auf das Wurzel/Spross-Verhältnis machte sich bei den K-Mangelvarianten erst bei sehr geringem K^+ -Angebot bemerkbar. Die in der 3. Woche beobachtete verlangsamte Entwicklung des Sprosses bei der 30 μM K-Variante führte zu einem Anstieg des Wurzel/Spross Verhältnisses, der jedoch noch nicht statistisch

abzusichern war. Selbst bei der K^+ -Mangel Variante führten die deutlich verringerten Wachstumsraten des Sprosses erst in der 2.Woche auf dem Mangelmedium zu einem signifikanten Anstieg des Wurzel/Spross Verhältnisses.

4.1.2 Frischmassenzunahme von *Lupinus albus* cv. AMIGA

Wie für die Rapspflanzen, so wurden auch für Lupinen (*Lupinus albus*, Sorte Amiga) die Wachstumsraten für verschiedene Kulturbedingungen ermittelt (Tabelle 8). Die Pflanzen wurden 6 - 7 Tage nach der Saat aus dem Keimbecken entnommen und auf Nährlösung umgesetzt. Zur Bestimmung der Zuwachsraten wurden 14, 21 und 28 Tage nach der Saat (1-3 Wochen nach Umsetzen auf Nährlösung) je 6 bis 9 Pflanzen entnommen und die Frischmassen bestimmt. Die Versuchsreihen wurden insgesamt 3-mal wiederholt, so dass zwischen 18 und 27 Einzelgewichte für jeden Zeitpunkt vorlagen. Nach Tabelle 2 (S.19) wurde aus den Tagesmittelwerten dann die relative Wachstumsrate errechnet.

Eine zeitliche Verzögerung der Keimung der NH_4^+ Variante konnte bei *Lupinus albus* L. nicht beobachtet werden.

Die Wachstumsraten der Lupinen lagen deutlich unter den bei Raps (Tabelle 7) festgestellten Werten. Genauso wie bei den Rapspflanzen war im Verlauf der Anzucht ein Absinken der relativen Wachstumsraten zu beobachten, das mit einem stetigen Anstieg des Wurzel / Spross - Verhältnisses einherging.

Aus den verhältnismäßig großen Lupinensamen entwickelten sich kräftige Keimlinge, die mit einem anfänglichen Wurzel / Spross - Verhältnis von $0,351 \pm 0,062$ (Ammonium-Variante: $0,355 \pm 0,078$) deutlich über den bei Raps festgestellten Werten lagen.

Ein Vergleich der relativen Wachstumsraten (Tabelle 8) zeigt, dass bei der RGR_{Wurzel} keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nitratvarianten (200 μM und 2000 μM), der Ammonium-Variante (200 μM) und den K^+ -Mangelvarianten (0 μM und 30 μM) auftraten. Bei der RGR_{Spross} lagen die Ammonium-Variante und die 2 mM-Nitratvariante zwar über den Werten der Kontrolle (200 μM NO_3^-), jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die K-Mangel-Varianten zeigen mit der Zeit ein Absinken der Wachstumsraten gegenüber den Kontrollpflanzen. In der Variante ohne Kalium ist das Absinken der RGR_{Spross} besonders stark ausgeprägt und ab der 2.Woche auf dem Mangelmedium ist eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle festzustellen.

E r g e b n i s s e

Bei den RGR_{Spross} der Ammoniumvariante und der 2 mM-Nitratvariante wirken sich die anfangs höheren Zuwachsraten dahingehend aus, dass das Wurzel / Spross-Verhältnis dieser Varianten langsamer ansteigt als bei der Kontrolle. Ein statistisch signifikanter Unterschied tritt bei der 2 mM-Nitratvariante bereits nach 2 Wochen, bei der Ammoniumvariante erst in der 3. Woche auf Nährlösung auf.

Den beiden K-Mangel - Varianten ($0 \mu\text{M K}^+$ und $30 \mu\text{M K}^+$) gelingt es trotz geringerer Wachstumsraten ein Wurzel / Spross-Verhältnis zu halten das dem der Kontrolle entspricht. Der deutliche Abfall der RGR_{Spross} in der $0 \mu\text{M K}$ -Variante lässt aber die Vermutung aufkommen, dass sich über einen längeren Untersuchungszeitraum eine weitere Verschiebung des Wurzel / Spross-Verhältnisses zu Gunsten der Wurzel abzeichnet.

Tabelle 8: Relative Wachstumsraten (RGR) von *Lupinus albus* L. unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die dunkel hervorgehobenen Wachstumsraten bzw. Wurzel/Spross-Verhältnisse zeigen einen signifikanten Unterschied (^a 1 %, ^b 5 % Niveau) zu den als Kontrolle geltenden Pflanzen der Anzucht mit $200 \mu\text{M NO}_3^-$ bei ausreichender Kaliumernährung.

Tage nach der Saat	RGR_{Spross}			RGR_{Wurzel}			Wurzel / Spross Verhältnis		
	14	21	28	14	21	28	14	21	28
$200 \mu\text{M NH}_4^+ \quad 700 \mu\text{M K}^+$	0,159	0,140	0,122	0,202	0,186	0,152	0,480	0,662	0,817 ^a
$200 \mu\text{M NO}_3^- \quad 700 \mu\text{M K}^+$	0,153	0,131	0,116	0,207	0,192	0,159	0,513	0,786	1,062
$2000 \mu\text{M NO}_3^- \quad 700 \mu\text{M K}^+$	0,171	0,143	0,128	0,214	0,196	0,157	0,475	0,688 ^b	0,842 ^a
$200 \mu\text{M NO}_3^- \quad 0 \mu\text{M K}^+$	0,149	0,114 ^b	0,093 ^a	0,199	0,183	0,137	0,499	0,808	1,100
$200 \mu\text{M NO}_3^- \quad 30 \mu\text{M K}^+$	0,155	0,129	0,111	0,213	0,194	0,148	0,527	0,831	1,077

4.2 Nitratreduktase von Raps und Lupine

Nach der Aufnahme von Nitrat über die Wurzeln der Pflanze muss das NO_3^- unter Aufwendung von Reduktionsäquivalenten ($\text{NADH}+\text{H}^+$) reduziert werden, bevor der Stickstoff zum Aufbau neuer Substanzen genutzt werden kann. Das erste Enzym in dieser Reduktionskette ist die Nitratreduktase (NR).

Der Ort der Nitratreduktion spielt für die Pflanze dabei eine wesentliche Rolle. Reduziert eine Pflanze einen großen Teil des aufgenommenen Nitrats bereits in der Wurzel, so muss die Wurzel vom Spross mit einer ausreichenden Menge von kurzkettigen C-Verbindungen versorgt werden, auf die der Stickstoff übertragen werden kann. Die in der Wurzel synthetisierten Aminosäuren müssen dann wieder in den Spross transportiert werden, wo sie von der Pflanze weiter verarbeitet werden.

Erfolgt hingegen die Nitratreduktion vornehmlich im Spross, so muss das Nitrat über die Leitungsbahnen des Xylems zunächst in die Blätter geleitet werden, wo dann die Reduktion und anschließende Syntheseschritte erfolgen. Zum Ladungsausgleich in den Blättern müssen dann aber andere Anionen über das Phloem zur Wurzel transportiert werden.

In Abhängigkeit vom Hauptort der Nitratreduktion ergeben sich somit unterschiedliche Stoffströme, welche die Pflanze aufrechterhalten muss, um ihre Stickstoff-Versorgung zu gewährleisten.

4.2.1 *In vitro* Nitratreduktaseaktivität (NRA)

Die Ergebnisse des in-vitro NRA-Test (Abbildung 8) zeigen, dass **Lupinen** (*Lupinus albus* L.) bei Anzucht mit 150 μM Nitrat die höchste Reduktionsleistung in den Wurzeln erreichen. Mit 2,08 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ liegt die Enzymaktivität in den Wurzeln um den Faktor 5,7 höher als in den Blättern bzw. den restlichen Teilen der Sprossachse. Die geringe Enzymaktivität in den Kotyledonen ist auf die weitgehende Rückbildung der Keimblätter zum Zeitpunkt der Probennahme zurückzuführen. Für die Ermittlung der Reduktionsleistung pro Pflanzenorgan spielen die Kotyledonen wegen ihres geringen Anteils an der Frischmasse der Pflanze zum Zeitpunkt der Ernte nur eine untergeordnete Rolle.

Werden die Frischmassen von Blättern, Sprossachse und Wurzeln mit der NRA dieser Fraktionen verrechnet, so ergibt sich der Anteil, den diese Fraktionen zur

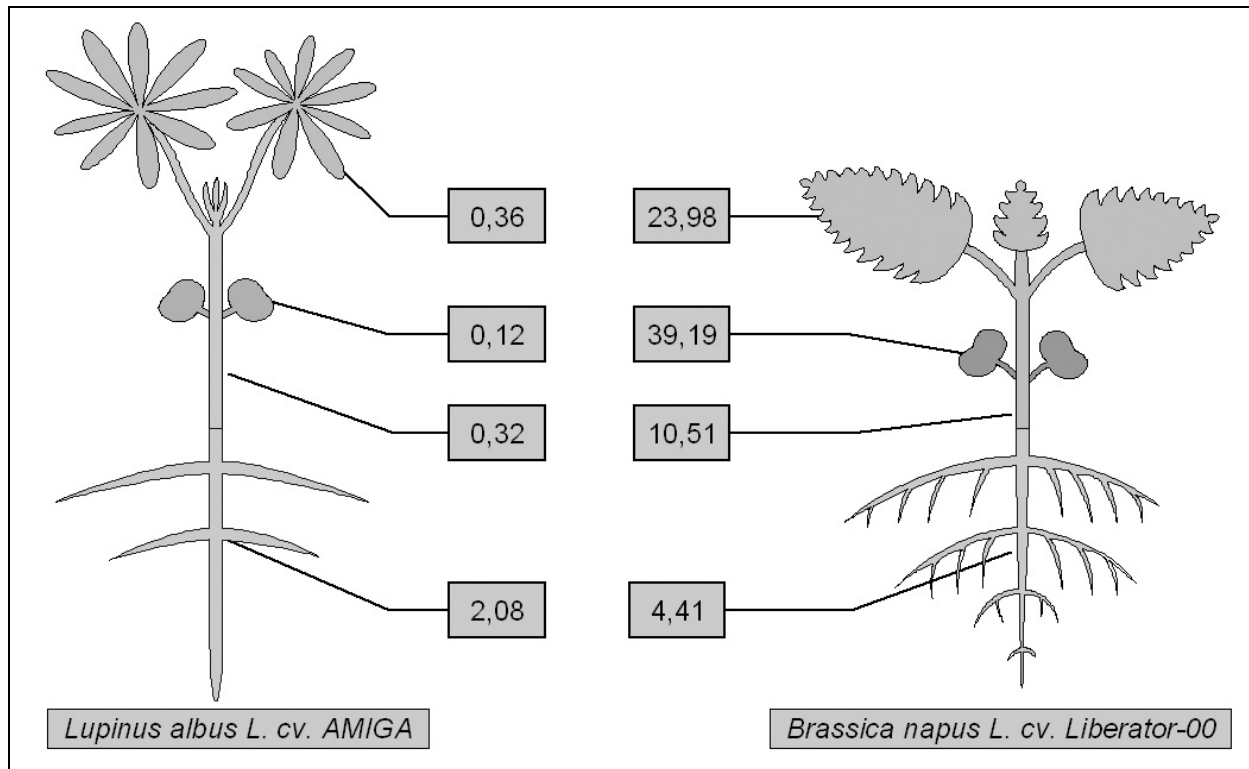


Abbildung 8: *In vitro* NRA (in $\mu\text{Mol Nitrat} / \text{g FM h}^{-1}$) von **Lupine** und **Raps** bei Anzucht mit 150 μM Nitrat. Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert der NRA von 8 Lupinen bzw. 12 Rapspflanzen dar. Zum Zeitpunkt des Enzymtests waren die Lupinen 27 d, die Rapspflanzen 21 d alt.

Nitratreduktion der Pflanze beitragen. Mit 76,5 % fällt der Wurzel von *Lupinus albus* der größte Teil der Reduktionsleistung zu, während auf die Blätter nur 13,9 % und die restliche Sprossachse 9,6 % entfallen (Tabelle 9).

Im Vergleich von *Lupinus albus* L. mit *Brassica napus* L. fällt auf, dass die **Rapspflanzen** eine deutlich höhere NRA aufweisen (Abbildung 8). Die geringste NRA ist in den Wurzeln der Rapspflanzen zu beobachten, doch liegt selbst hier die Enzymaktivität mit $4,41 \mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}^{-1}$ um den Faktor 2,1 über derjenigen der Lupinen (2,08). Die höchste Enzymaktivität wird bei den Rapspflanzen, abgesehen von den Kotyledonen, in den Blättern gemessen. Mit $23,98 \mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}$ ist die Reduktionsleistung der Blätter somit 5,7-mal höher als die der Wurzeln. Die NRA der Sprossachse nimmt mit $10,51 \mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}^{-1}$ bei den Rapspflanzen eine Mittelstellung zwischen den für Blatt und Wurzel ermittelten Werten ein.

Die bislang angegebenen absoluten Enzymaktivitäten für die verschiedenen Pflanzenorgane gaben nur einen Hinweis auf die Reduktionsleistung in den Fraktionen

(NRA_{absolut}). Zur Bestimmung der Verteilung der Reduktionsleistung in der Pflanze ist es aber erforderlich, die Frischmassen der Fraktionen mit in die Berechnung einzubeziehen (NRA_{relativ}). Dieser Wert spiegelt die Reduktionsleistung der Pflanze besser wider, wenn nicht die Enzymaktivitäten, sondern Transportprozesse im Mittelpunkt stehen (Tabelle 9).

Die hohe NRA der Kotyledonen (Abbildung 8) täuscht darüber hinweg, dass zur Erntezeit ein Teil der Versuchspflanzen bereits die Kotyledonen abgeworfen hatte und nur die noch an den Pflanzen befindlichen Keimblätter für den Enzymtest verwendet wurden. Zur Berechnung der Reduktionsleistung der einzelnen Fraktionen wurden die Kotyledonen daher nicht berücksichtigt.

Da bei **Raps** die Blätter mit 53,3 % den größten Anteil der Frischmasse ausmachen, ist der NRA in den Blättern eine starke Bedeutung beizumessen. Nach Verrechnung der Frischmassen der einzelnen Fraktionen mit der ermittelten NRA ergibt sich, dass bei Raps 81,3 % der Nitratreduktion von den Blättern geleistet wird, während Wurzel und Sprossachse nur 9,1 % bzw. 9,6 % zur Reduktionsleistung der Pflanze beitragen.

Bei der **Lupine** ist die Frischmasse von allen 3 Fraktionen annähernd gleich, wobei die Sprossachse in ihrem Anteil an der gesamten Frischmasse gegenüber den anderen Fraktionen abfällt. Wegen den fast identischen Anteilen von Blatt, Sprossachse und Wurzel an der Frischmasse ergeben sich bei der Lupine nur geringe Unterschiede zwischen der absoluten Reduktionsleistung in den 3 Fraktionen (NRA_{absolut}) und dem

Tabelle 9: Einfluss der Frischmasse der verschiedenen Pflanzenfraktionen auf die Bestimmung der Verteilung der NRA.

	Frischmasse der Fraktionen in % der Gesamtmasse	NRA [$\mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$]	NRA (absolut)	NRA (relativ)
Lupinus albus L.				
Blatt	36,9%	0,354	12,9%	13,9%
Sprossachse	28,5%	0,316	11,5%	9,6%
Wurzel	34,6%	2,075	75,6%	76,5%
Brassica napus L.				
Blatt	53,3%	23,980	61,6%	81,3%
Sprossachse	14,4%	10,510	27,0%	9,6%
Wurzel	32,3%	4,410	11,3%	9,1%

Anteil der Fraktionen an der gesamten Nitratreduktion der Pflanze (NRA_{relativ}). Mit 76,5% übernehmen die Wurzeln den größten Anteil an der Nitratreduktion, gefolgt von den Blättern (13,9%) und der Sprossachse (9,6%).

4.2.2 *In vivo* Nitratreduktase von *Brassica napus* L.

4.2.2.1 Einfluss des Nitratangebots auf die Nitratreduktion

Mit zunehmendem Nitratangebot ist eine Steigerung der NRA in allen untersuchten Fraktionen verbunden (Abbildung 9). Die Reduktionsleistung der Blätter zeigt bei einer Zunahme des Nitratangebotes von 100 auf 2000 μM eine Steigerung der NRA von 3,4 auf 7,06 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ (+107 %). Im selben Bereich des Nitratangebotes fallen die Zunahmen der NRA der Sprossachse von 1,63 auf 2,75 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ (+ 69 %) und der Wurzel von 0,86 auf 1,38 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ (+ 60 %) deutlich geringer aus. Zwar ist über den gesamten Bereich des Nitratangebotes eine Zunahme der NRA zu beobachten, jedoch ist die Steigerung der Enzymaktivität nicht direkt proportional zum Nitratangebot. Bei geringem Angebot geht eine Zunahme des Angebotes mit einer höheren Steigerung der NRA einher, als dies bei hohem Nitratangebot ($> 1 \text{ mM}$) der Fall ist. So steigt im Bereich von 100 bis 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ die NRA der Blätter um 0,87 Einheiten / 100 $\mu\text{M NO}_3^-$, während die Zunahme zwischen 250 und 1000 μM auf

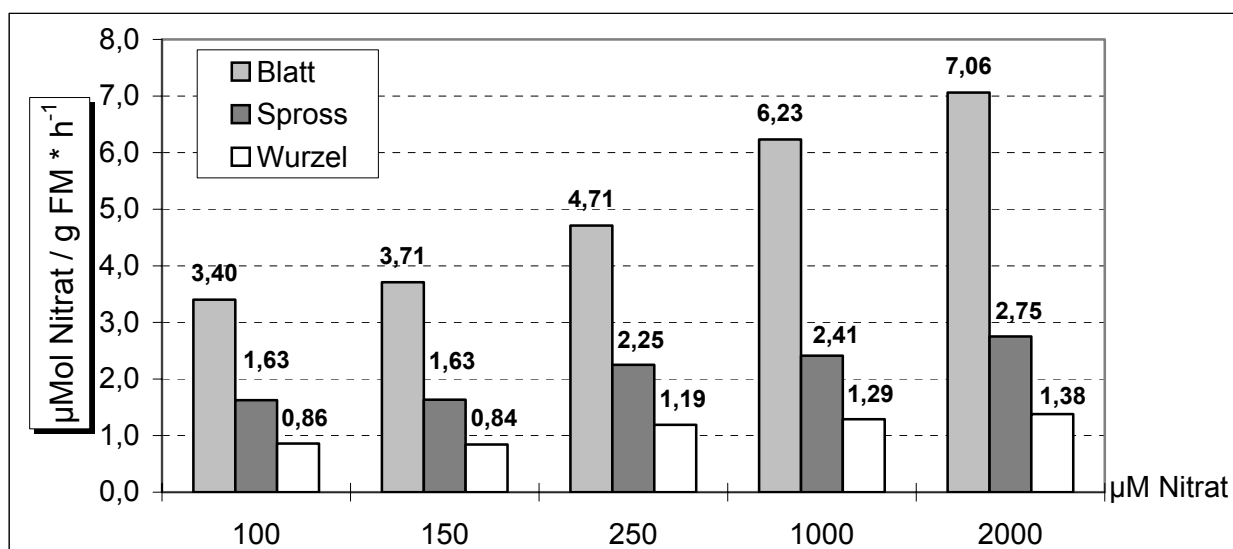


Abbildung 9: *In vivo* NRA in Blatt, Spross und Wurzel von *Brassica napus* L. bei Anzucht mit verschiedenen Nitratkonzentrationen. Von jeder Variante wurden mindestens 6 Pflanzen geerntet. Die Ernte erfolgte 20 d nach der Saat, 2 $\frac{1}{2}$ h nach Beginn der Photoperiode.

E r g e b n i s s e

Tabelle 10: Anteil der Fraktionen an der Frischmasse und relative NRA-Werte von *Brassica napus* L. bei unterschiedlicher NO_3^- -Konzentration im Medium (s. Abbildung 9).

NRA in $\mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$	Nitratangebot				
	100 $\mu\text{M NO}_3^-$	150 $\mu\text{M NO}_3^-$	250 $\mu\text{M NO}_3^-$	1000 $\mu\text{M NO}_3^-$	2000 $\mu\text{M NO}_3^-$
Blatt	3,4	3,71	4,71	6,23	7,06
Spross	1,63	1,63	2,25	2,41	2,75
Wurzel	0,86	0,84	1,19	1,29	1,38

Verhältnis der NRA der Fraktionen

(Gesamtpflanze = 100%)

Blatt	57,8%	60,0%	57,8%	62,7%	63,1%
Spross	27,6%	26,4%	27,6%	24,3%	24,6%
Wurzel	14,6%	13,6%	14,6%	13,0%	12,3%

Anteil der Fraktionen an der Frischmasse

(Gesamtpflanze = 100%)

Blatt	51,2%	53,3%	58,1%	59,2%	60,2%
Spross	13,4%	14,4%	14,3%	14,5%	14,8%
Wurzel	33,9%	32,3%	31,0%	28,7%	27,5%

Anteil der Fraktionen an der Reduktionsleistung der Pflanze

(Gesamtpflanze = 100%)

Blatt	77,4%	79,6%	79,9%	83,6%	84,4%
Spross	9,7%	9,5%	9,4%	8,0%	8,1%
Wurzel	13,0%	10,9%	10,8%	8,4%	7,5%

0,20 Einheiten / 100 $\mu\text{M NO}_3^-$ absinkt. Zwischen 1000 μM und 2000 μM steigt die NRA dann nur noch um 0,08 Einheiten / 100 μM Nitrat.

Die Steigerung des Nitratangebotes ist aber nicht nur mit einer Zunahme der NRA verbunden, sondern bewirkt auch ein Verschieben des Verhältnisses Wurzel / Spross zu Gunsten des Sprosses. Dies verstärkt die Bedeutung der Blätter als Hauptort der Nitratreduktion bei *Brassica napus* L. und führt zu der in Tabelle 10 dargestellten Entwicklung der Reduktionsleistung der einzelnen Pflanzenfraktionen.

4.2.2.2 Induktion der NRA bei NH_4^+ - ernährten Pflanzen

Rapspflanzen wurden mit 100 $\mu\text{M NH}_4^+$ angezogen und anschließend auf ein Medium mit 100 $\mu\text{M NO}_3^-$ umgesetzt. Der Enzymtest wurde 2,5 h nach Einsetzen der Photoperiode an 8 Pflanzen pro Variante durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten die 2 h bzw. 6 h induzierten Varianten, bei denen der NR-Test erst 4,5 bzw. 8,5 h nach Beginn

der Photoperiode durchgeführt werden konnte. Zum Zeitpunkt der Ernte waren alle Pflanzen 23 d alt. Nitrat-induzierte Pflanzen wurden 1 d bzw. 2 d vor der Ernte auf Medium mit NO_3^- umgestellt. Als Kontrolle dienten kontinuierlich mit NO_3^- -ernährte Rapspflanzen, die zum Zeitpunkt der Ernte ein Alter von 19 d erreicht hatten.

Die untersuchten Rapspflanzen zeigten selbst bei Anzucht mit 100 μM Ammonium eine NRA, die bei ca. 20 % der NRA von NO_3^- -ernährten Pflanzen lagen (Tabelle 11). Mit nur 13 % der Reduktionsleistung von NO_3^- -induzierten Pflanzen lag die NRA der Wurzeln deutlich niedriger als diejenige von Blättern und Spross.

Nach dem Umstellen der Ernährung von NH_4^+ auf NO_3^- steigt die NRA in den Wurzeln innerhalb von 2 h von 0,11 auf 0,3 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ an (+172%), während der Anstieg im Spross, von 0,47 auf 0,51 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$, mit +9% sehr gering ausfällt. Die Blätter zeigen zwar eine Zunahme der NRA von 0,7 auf 0,86 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$, jedoch entspricht dies nur einer Zunahme von 23%. In den Kotyledonen ist ein Anstieg von 0,58 auf 0,76 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ (+31%) zu erkennen. Da die Keimblätter

Tabelle 11: Induktion der NRA bei *Brassica napus* L. nach Umstellung von 100 μM NH_4^+ auf ein Medium mit 100 μM NO_3^- . Als Kontrolle dienten kontinuierlich mit NO_3^- angezogene Rapspflanzen.

NRA von Raps nach Umstellung der N-Quelle von NH_4^+ auf NO_3^-

$\mu\text{Mol / g FM h}^{-1}$	NH_4^+	$\rightarrow 2\text{h NO}_3^-$	$\rightarrow 6\text{h NO}_3^-$	$\rightarrow 1\text{d NO}_3^-$	$\rightarrow 2\text{d NO}_3^-$	Kontrolle
Blatt	0,70	0,86	1,64	2,99	3,33	3,40
Kotyledonen	0,58	0,76	1,36	1,04	1,10	1,08
Spross	0,47	0,51	0,87	1,39	1,54	1,63
Wurzel	0,11	0,30	0,56	0,84	0,88	0,86

Verhältnis der NRA in verschiedenen Fraktionen

(Gesamtpflanze=100%)

Blatt	54,6%	51,4%	53,4%	57,3%	57,9%	57,8%
Spross	36,7%	30,8%	28,3%	26,7%	26,9%	27,6%
Wurzel	8,7%	17,8%	18,3%	16,1%	15,2%	14,6%

NRA in % der induzierten Kontrolle

(Gesamtpflanze=100%)

Blatt	20,6%	25,2%	48,3%	87,9%	97,8%	100,0%
Spross	28,9%	31,6%	53,6%	85,7%	95,0%	100,0%
Wurzel	13,0%	34,6%	65,6%	97,7%	102,0%	100,0%

einerseits als Speicherorgan dienen und andererseits auch einen hohen Stoffwechsel aufweisen, ist es möglich, dass hier inaktivierte NR aktiviert wird und so schon in einer frühen Phase der Stoffwechselumstellung zur Nitratreduktion beiträgt. Die Kotyledonen werden, da sie unterhalb der Primärblätter ansetzen, auch vor diesen mit Nitrat versorgt und sie sind daher früher in der Lage, ihren Stoffwechsel umzustellen. Ob der Beitrag der Keimblätter zur Nitratreduktion jedoch von bedeutender Rolle ist, erscheint jedoch fraglich. Wegen ihrer geringen Frischmasse können sie nämlich trotz der hohen Enzymaktivität nur geringe Mengen von NO_3^- umsetzen und liefern so nur einen geringen Beitrag zur gesamten Reduktionsleistung der Pflanze.

6 h nach der Umstellung auf NO_3^- -Ernährung ist in allen Pflanzenteilen mindestens eine Verdoppelung der NRA festzustellen (Tabelle 11). Durch die deutliche Zunahme ihrer NRA hat die Wurzel bis zu diesem Zeitpunkt stark an Bedeutung für die Nitratreduktion gewonnen. Mit $0,56 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ liegt die NRA der Wurzel zwar erst bei 65,6% der enzymatische Aktivität der Kontrolle ($0,86 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$), jedoch liegt der Beitrag der Wurzel zur Nitratreduktion der Pflanze mit 18,3% höher als in der Kontrolle (14,6% Anteil der Wurzel an Gesamt-NRA der Pflanze) oder als zu allen anderen Probenahmen nach Beginn der NO_3^- -Ernährung.

Im Lauf der nächsten 2 Tage steigt die Reduktionsleistung in den verschiedenen Pflanzenteilen weiter an und es werden die Enzymaktivitäten erreicht, die auch in NO_3^- -induzierten Kontrollpflanzen beobachtet werden. Während dieser Phase ist die Zunahme der NRA in den Blättern stärker als in den Wurzeln, wodurch sich der Anteil des Sprosses an der Reduktionsleistung der Pflanze wieder erhöht.

4.2.2.3 Circadiane Rhythmik der Nitratreduktase und Einfluss von K^+ auf den in-vivo Nitratreduktasetest

Da die Nitratreduktion einen hohen Bedarf an Reduktionsäquivalenten und ATP hat, ist es wahrscheinlich, dass sich in Abhängigkeit von der energetischen Versorgung der Pflanze Schwankungen in der Enzymaktivität ergeben.

Die Rapspflanzen wurden etwas abweichend von den in 3.2.3 beschriebenen Kulturbedingungen angezogen (Abbildung 10) und zwei Stunden nach Erreichen der vollen Lichtstärke geerntet, in die Fraktionen Blatt, Sprossachse und Wurzel aufgeteilt und für den *in vivo* NR-Test vorbereitet.

Wie sich bei Untersuchungen an Weizen zeigte (Blevins et al, 1978), nimmt K^+ Einfluss auf den Nitratstoffwechsel und beeinflusst NRA und NO_3^- -Gehalt in Wurzel und Spross der Pflanze. Deshalb wurde hier der Tagesgang der NRA von *Brassica napus* L. an 2 Varianten untersucht, von denen eine (A) kontinuierlich auf Nährlösung mit K^+ angezogen wurde, während die andere Variante (C) 1 Woche vor Versuchsbeginn auf K^+ - Mangel gesetzt wurde.

Da die Pufferlösungen für den *in vivo* NRA-Test jedoch K^+ enthalten (vgl. 3.3.2), war nicht auszuschließen, dass das in den Reagenzien enthaltene K^+ einen Einfluss auf den Ausgang des Tests hat. Aus diesem Grund wurde für den *in vivo* NRA-Test eine Reaktionslösung vorbereitet, welche statt der Kaliumsalze die entsprechenden Natriumsalze enthielt. Von den je 3 Fraktionen der beiden Varianten wurde jeweils ein Teil mit der „normalen“, der andere Teil mit der K^+ -freien Reaktionslösung für die

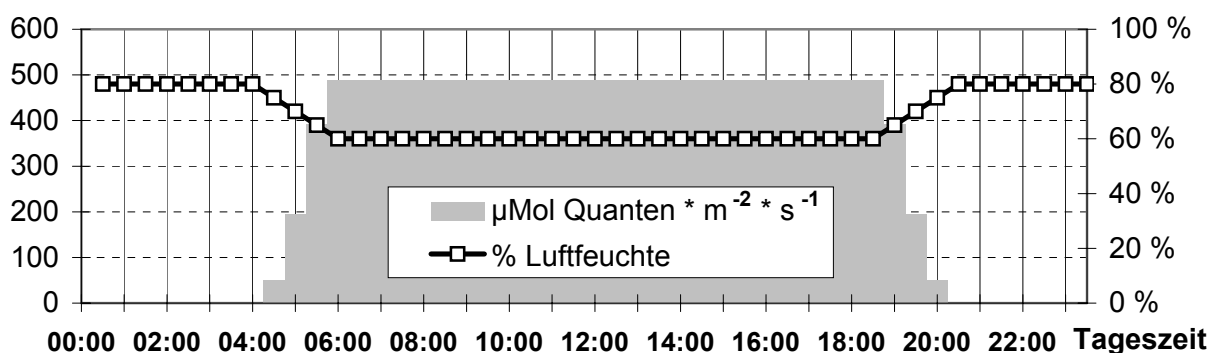


Abbildung 10: Regulierung von Lichtstärke und Feuchte im Tagesgang. Die Temperatur betrug in der Dunkelpphase 16,5°C und wurde in der Lichtphase auf 21,5°C erhöht. Bei der Befeuchtung der Luft in der Klimakammer traten am Tag kurzfristige Temperaturschwankungen von $\pm 1,5$ °C auf.

Bestimmung der NRA eingesetzt. Es ergeben sich somit 4 Varianten, deren Ergebnisse in Abbildung 11 und Abbildung 12 (S.56 und 57) dargestellt sind:

K^+ - Ernährung

- A Anzucht mit 700 μM K^+ , NRA-Test mit K^+ -haltigen Reagenzien
- B Anzucht mit 700 μM K^+ , NRA-Test mit Reagenzien ohne K^+

K^+ - Mangel

- C 1 Woche K^+ -Mangel, NRA-Test mit Reagenzien ohne K^+
- D 1 Woche K^+ -Mangel, NRA-Test mit K^+ -haltigen Reagenzien

In den **Blättern** der Rapspflanzen der K^+ -Variante (Abbildung 11 A+B) war im Tagesgang ein Anstieg der NRA bis zur Mitte der Photoperiode zu beobachten, gefolgt von einem Rückgang der enzymatischen Aktivität gegen Ende der Photoperiode.

Die sehr hohe NRA zur zweiten Probennahme der K-Mangelvarianten (Abbildung 12 C+D) könnte auf einen schnellere Zunahme der Enzymaktivität bei dieser Variante deuten. Aufgrund der geringen Anzahl der Wiederholungen lässt sich diese Vermutung nicht statistisch festigen. Da zudem nur zu diesem Termin die NRA der Mangelvariante über derjenigen der K^+ -Variante lag, muss die Aussagekraft dieses Messwertes in Frage gestellt werden.

Demnach zeigen die Versuchsergebnisse, abgesehen vom 2. Messwert der K-Mangelvarianten, dass die Blätter aller Varianten die höchste NRA in der Mitte bzw. am frühen Nachmittag der Photoperiode aufweisen.

Die NRA im **Spross** der K^+ -Variante (A, B) weist zwar schwankende Enzymaktivitäten im Verlauf des Tages auf, jedoch folgen die Kurvenverläufe mit K-haltiger und K-freier Reaktionslösung nicht demselben Trend, obwohl das Pflanzenmaterial aus derselben Probe stammte. Dies spricht dafür, dass die schwankenden Messwerte eher Ungenauigkeiten in der Messmethode als einer circadianen Rhythmik zuzuordnen sind. Bei der K-Mangelvariante (C, D) zeigen die Kurvenverläufe bei Durchführung des Enzymtests mit K-haltiger (C) bzw. K-freier Reaktionslösung (D) deutliche Unterschiede (Abbildung 12).

Bei Verwendung K-freier Reaktionslösung (C) scheint zur 2. Probennahme (10⁰⁰ Uhr) im Spross noch vor der Mitte der Photoperiode die höchste Enzymaktivität erreicht zu sein. Danach ist eine kontinuierliche Abnahme der Reduktionsleistung bis zur letzten

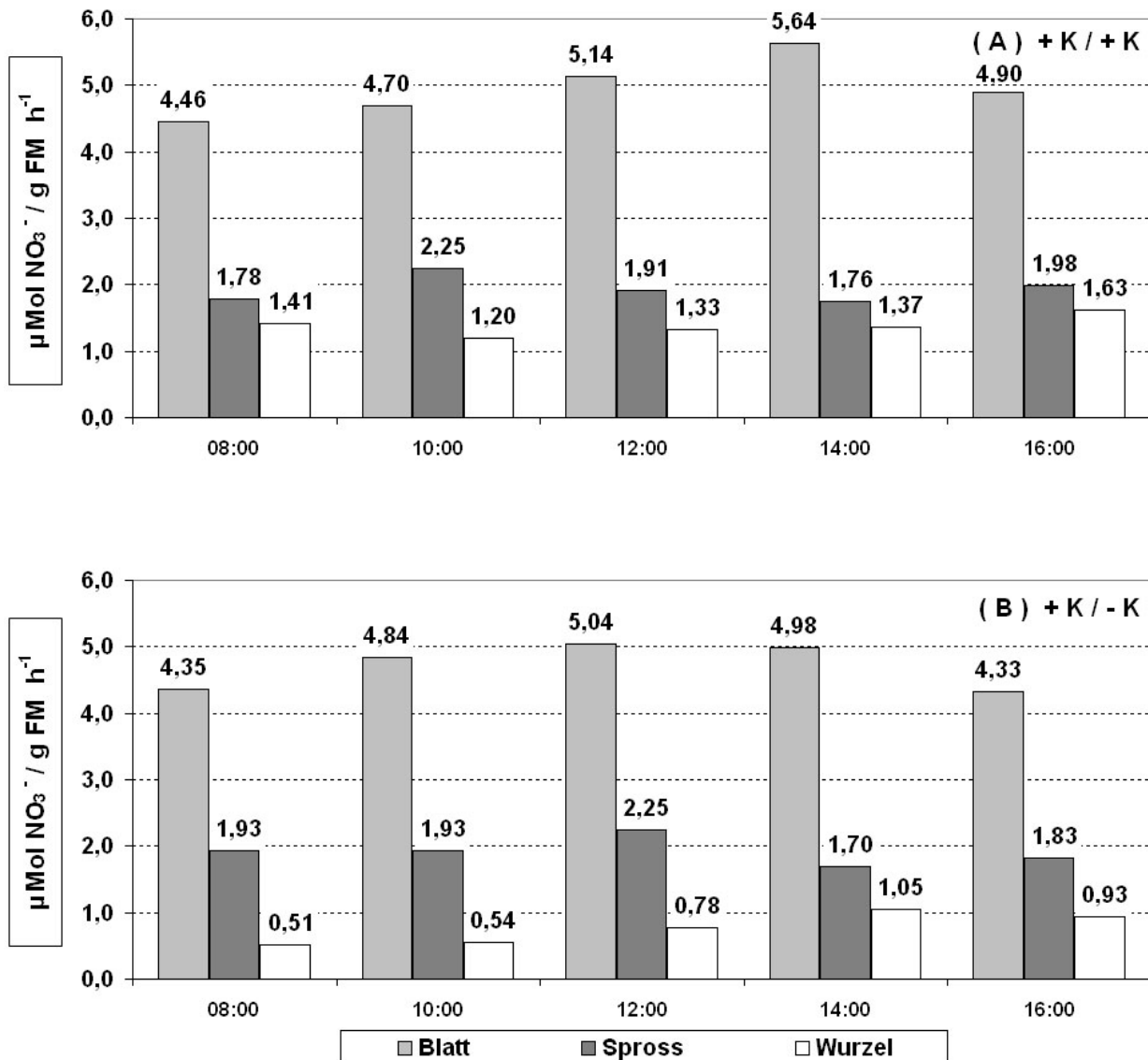


Abbildung 11: Circadiane Schwankungen der NRA von Rapspflanzen (*Brassica napus* L.), die mit 250 μM Nitrat unter ausreichender **Kaliumernährung** (700 μM) angezogen wurden.

In Variante **(A)** wurden bei der Durchführung des NRA-Test Kaliumsalze (30 mM KNO_3 und 100 mM KH_2PO_4) verwendet, während in Variante **(B)** der NRA-Test mit denselben Konzentrationen der entsprechenden Natriumsalze vorgenommen wurde. Die Pflanzen beider Varianten wurden bis zur Ernte auf derselben Nährlösung angezogen. Bei jeder Probennahme wurden jeweils 6 Pflanzen pro Variante geerntet und für den NRA-Test eingesetzt.

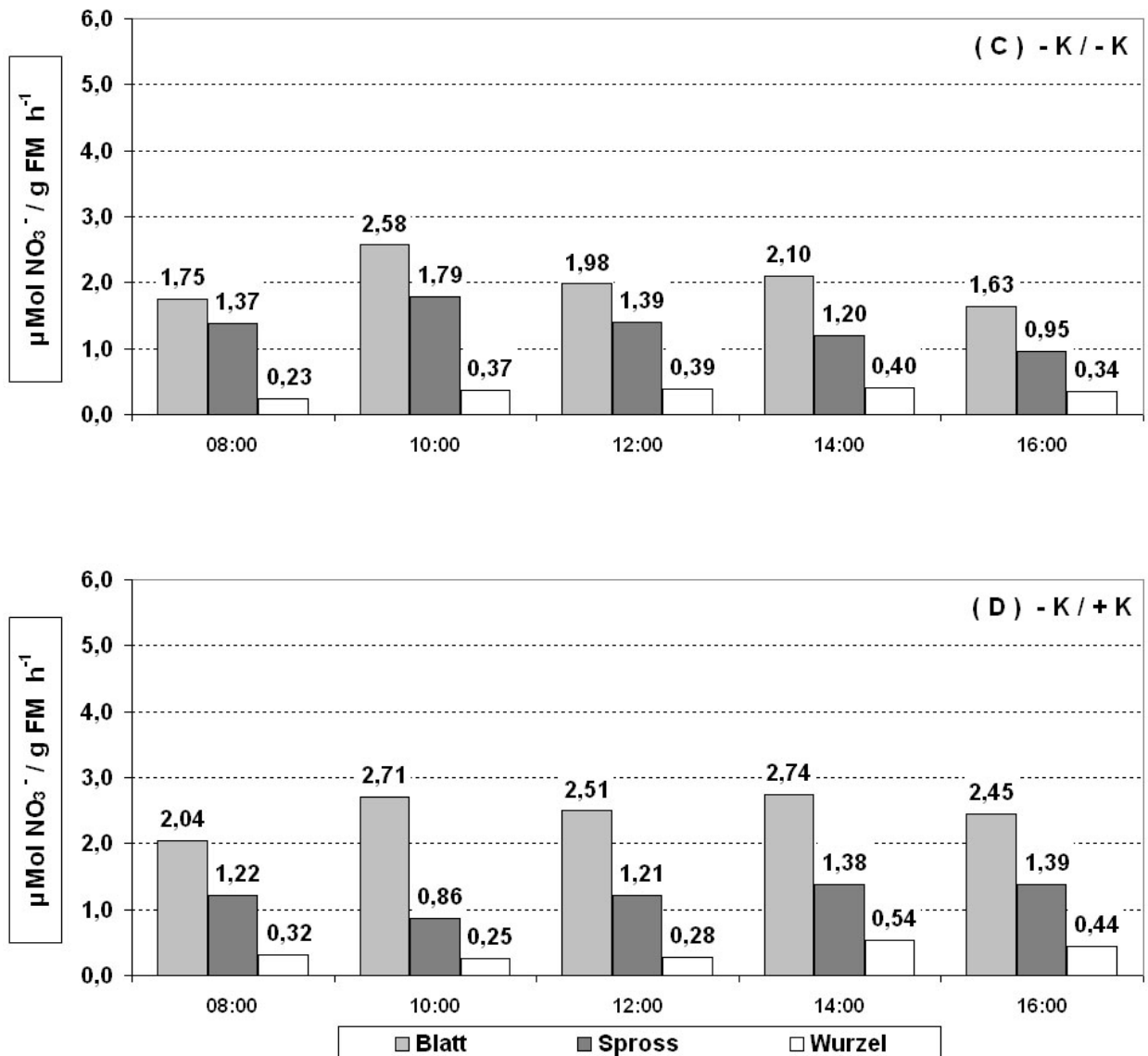


Abbildung 12: Circadiane Schwankungen der NRA von Rapspflanzen (*Brassica napus* L.), die mit 250 μM Nitrat unter **Kaliummangel** angezogen wurden.

In Variante **(C)** wurden bei der Durchführung des NRA-Test Natriumsalze (30 mM NaNO₃ und 100 mM NaH₂PO₄) verwendet, während in Variante **(D)** der NRA-Test mit denselben Konzentrationen der entsprechenden Kaliumsalze vorgenommen wurde. Die Pflanzen beider Varianten wurden bis zur Ernte auf derselben Nährlösung angezogen. Bei jeder Probennahme wurden jeweils 6 Pflanzen pro Variante geerntet und für den NRA-Test eingesetzt.

Probennahme zu beobachten. Wird der Test hingegen mit K-haltiger Reaktionslösung (D) durchgeführt, so ist bei der 2. Probennahme (10⁰⁰ Uhr) ein Minimum der Enzymaktivität erreicht. Bis zum Ende der Photoperiode erfolgt dann ein Anstieg der NRA.

Die gegensätzlichen Kurvenverläufe bei Verwendung derselben Probe für die enzymatischen Tests lassen folglich keine Aussage über eine circadiane Rhythmik der NRA im Spross zu.

In den **Wurzeln** der K⁺-Variante (Variante A in Abbildung 11) liegt die ermittelte NRA bei Bestimmung mit K-haltiger Reaktionslösung fast doppelt so hoch wie bei Verwendung eines K-freien Mediums (Variante B). In beiden Fällen zeigt die Enzymaktivität jedoch einen ähnlichen Verlauf im Tagesgang. Nach einer Abnahme der Reduktionsleistung zu Beginn der Photoperiode steigt die NRA bis zum Ende der Photoperiode wieder an.

Bei der K-Mangelvariante (Variante C und D in Abbildung 12) findet sich derselbe Kurvenverlauf wieder, wobei hier bei der letzten Probennahme bereits ein Rückgang der Enzymaktivität zu beobachten ist. Die NRA der Wurzeln von *Brassica napus* L. folgt somit mit einer zeitlichen Verzögerung der Enzymaktivität in den Blättern.

Die Verwendung einer K⁺-freien Reaktionslösung hat bei K⁺-ernährten Rapspflanzen (Variante B in Tabelle 12 und Abbildung 11) keinen, oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die NRA in den Blättern oder im Spross. Der NRA-Test an den Wurzeln der K⁺-ernährten Variante liefert jedoch bei der Verwendung von K⁺-freier Reaktionslösung (Variante B) eine um ca. 45% geringere Enzymaktivität im Vergleich zum Einsatz der K⁺-haltigen Reagenzien (Variante A). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass entweder eine Hemmung der Wurzel-NRA durch Na⁺ vorliegt, oder K⁺ einen positiven Effekt auf die Enzymaktivität in den Wurzeln hat.

Betrachtet man die Ergebnisse der K⁺-Mangelvarianten (C und D), so sind in Sprossachse und in den Wurzeln keine großen Unterschiede zwischen den beiden NRA-Tests festzustellen (Tabelle 12). In den Blättern liegt die gemessene NRA ca. 25% höher, wenn die Reaktionslösung ca. 100 mM K⁺ (D) statt 100 mM Na⁺ (C) enthält. Auch hier

liegt der Schluss nahe, dass NRA in den Blättern der K⁺-Mangelvariante entweder durch Na⁺ gehemmt wird, oder dass sie durch K⁺ eine Stimulierung erfährt.

Tabelle 12: Einfluss von Kalium in der Reaktionslösung des *in vivo* NRA-Tests auf die NRA (in $\mu\text{Mol Nitrat} / \text{FM h}^{-1}$) bei *Brassica napus L.* Die Anzucht erfolgte mit K^+ (**A, B**) oder bei 1 wöchigem K-Mangel (**C, D**) bei $250 \mu\text{M NO}_3^-$. Alle Pflanzen waren zur Ernte im 4-Blatt Stadium. Die Ernte erfolgte in 2-stündigen Abstand am Versuchstag und die Ergebnisse wurden anschließend gemittelt. (Mittelwerte von 20 Pflanzen / Variante)

NRA <i>Brassica napus L.</i>	A	B	B in % von A	C	D	D in % von C	D in % von A
Anzucht mit	K^+	K^+		Na^+	Na^+		
NRA Testmedium mit	K^+	Na^+		Na^+	K^+		
Blatt	4,97	4,71	95%	2,01	2,49	124%	50%
Spross	1,94	1,93	100%	1,34	1,21	90%	63%
Wurzel	1,39	0,76	55%	0,35	0,37	105%	26%

Wenn man bei den durchgeführten NRA-Tests die vorausgegangene K-Ernährung der Pflanzen berücksichtigt, so muss davon ausgegangen werden, dass sämtliche Fraktionen der Varianten A und B eine gute K^+ -Versorgung hatten, während in den Fraktionen der Varianten C und D wegen des vorangegangenen K^+ -Mangels eine Unterversorgung mit K^+ bestand. Da der größte Teil der Nitratreduktion von *Brassica napus L.* in den Blättern abläuft, sind die Effekte auf die Enzymaktivität in diesem Pflanzenorgan besonders kritisch für die Pflanze.

Die in allen Fraktionen deutlich geringere NRA bei der K^+ -Mangelvariante kann jedoch auch darauf hindeuten, dass neben einer Hemmung durch Na^+ auch die Konzentration des Enzyms in den Zellen bei K-Mangel niedriger ist als bei K-Ernährung.

4.2.3 *In vivo* Nitratreduktase von *Lupinus albus L.* bei kontinuierlicher Versorgung mit K^+ und unter K-Mangel

Um zu bestimmen, welchen Einfluss K^+ im Medium auf die NRA von *Lupinus albus L.* zeigt, wurden Pflanzen nach dem Auflaufen zunächst für 10 d auf einem Nährmedium angezogen, das $150 \mu\text{M NO}_3^-$ und $700 \mu\text{M K}^+$ enthielt. Ein Teil der Pflanzen wurde dann für mehrere Tage auf ein Medium ohne K^+ umgesetzt. Die Ernte der Pflanzen und die Durchführung des NRA-Tests erfolgte 4 h nach Einsetzen der Photoperiode, 26 d nach dem Auflaufen.

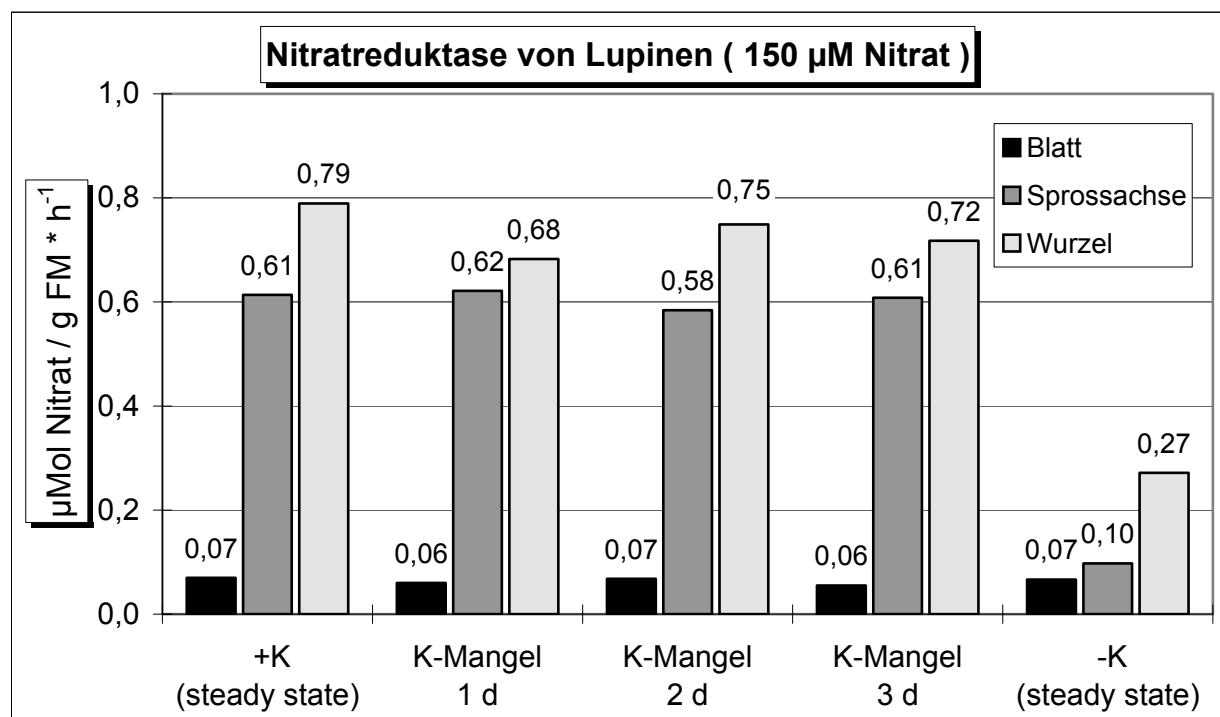


Abbildung 13 : Einfluss der K^+ -Ernährung auf die NRA von *Lupinus albus* L. (Mittelwerte von je 12 Pflanzen / Variante)

Lupinen, die für 16 d auf einem K-Mangelmedium angezogen wurden (Abbildung 13, $-\text{K}_{\text{steady state}}$), zeigen eine deutlich niedrigere Nitratreduktion als die K^+ -ernährten Pflanzen ($+\text{K}_{\text{steady state}}$). Während die NRA in den Blättern unverändert niedrig war, betrug die NRA in den Wurzeln mit $0,27 \mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$ nur 34% der Enzymaktivität K-ernährter Lupinen. In der Sprossachse lag die NRA mit $0,10 \mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$ sogar nur bei 16% des Wertes der Kontrolle.

Pflanzen, welche 1-3 d vor dem Versuchstermin von Vollmedium auf ein Medium ohne K^+ umgesetzt wurden, reagierten mit einer leichten Abnahme der NRA in den Wurzeln. Wegen der Größe der Versuchspflanzen in einem Alter von 26 d ist davon auszugehen, dass die Pflanzen schon über einen großen K-Vorrat verfügten und daher nur eine schwache Reaktion auf den K-Mangel zeigten. Bei Fortführen der Mangelsituation wäre voraussichtlich ein stärkerer Rückgang der NRA zu beobachten gewesen.

4.2.3.1 Einfluss von K^+ und Na^+ im Testmedium des NRA-Tests auf die Bestimmung der NRA von *Lupinus albus* L.

Zur Bestimmung des Effekts von K^+ und Na^+ auf das Ergebnis des NRA-Tests bei *Lupinus albus* L. wurden Pflanzen mit 250 μM NO_3^- und 700 μM K^+ angezogen. Ein Teil der Pflanzen wurde 18 d nach Auflaufen auf ein Medium ohne K^+ umgesetzt. Die Ernte der Pflanzen und die Durchführung des NRA-Tests erfolgte 25 d nach dem Auflaufen, 4 h nach Einsetzen der Photoperiode.

In den **Blättern** aller Varianten liegt die NRA mit 0,07 $\mu Mol / g FM h^{-1}$ auf einem sehr niedrigem Niveau (Tabelle 13), nahe an der Nachweisgrenze des Enzymtests. Es lassen sich keine Unterschiede bei der NRA-Bestimmung in den Blättern der verschiedenen Varianten feststellen.

Im **Spross** zeigen sich bei Na^+ oder K^+ im NRA-Testmedium zwar geringe Unterschiede, jedoch lassen sich diese nicht statistisch absichern. Die Pflanzen im K-Mangelmedium (C) weisen allerdings im Vergleich mit den kontinuierlich mit K^+ -versorgten Pflanzen (A) eine reduzierte NRA.

In der **Wurzel** wirkt sich Na^+ im Medium des Enzymtests (Variante B und C) negativ auf die Höhe der NRA aus. Bei den Mangelpflanzen lag die NRA um 34% unter der Enzymaktivität der mit K^+ ernährten Variante.

Tabelle 13 :Einfluss von K^+ und Na^+ in der Reaktionslösung des *in vivo* NRA-Tests auf die NRA von *Lupinus albus* L. Die Anzucht erfolgte mit K^+ (**A**, **B**) oder bei 1 wöchigem K-Mangel (**C**, **D**) bei 250 μM NO_3^- . Alle Pflanzen waren zur Ernte 25 d alt. (Mittelwerte von 12 Pflanzen / Variante)

NRA <i>Lupinus albus</i> L.	A	B	B in % von A	C	D	D in % von C	D in % von A
Anzucht mit	K^+	K^+		Na^+	Na^+		
NRA Testmedium mit	K^+	Na^+		Na^+	K^+		
Blatt	0,07	0,07	100%	0,07	0,07	100%	100%
Spross	0,64	0,61	95%	0,52	0,56	108%	88%
Wurzel	0,96	0,75	78%	0,57	0,63	105%	66%

4.3 Stickstoff - Stoffwechsel

In den ersten Tagen nach dem Auflaufen der Pflanze übernehmen die Keimblätter die Aufgabe der Photosynthese und dienen vielfach auch noch als ein Organ, das die ursprünglich im Samen gespeicherten Nährstoffe der Pflanze zur Verfügung stellt (**Ehrendorfer**, 1983). Mit dem Erscheinen der Primärblätter wird die Photosynthese zu einem großen Teil von diesen übernommen und die Kotyledonen verlieren an Bedeutung. Der Zeitpunkt, an dem die Kotyledonen schließlich von den Pflanzen abgeworfen werden, hängt nicht nur von den Ernährungsbedingungen, sondern auch von der Individualentwicklung der Pflanzen ab. So warfen die Pflanzen der Kalium-Mangelvariante ihre Keimblätter recht früh ab, während die mit $2000 \mu\text{M NO}_3^-$ ernährten Rapspflanzen die Kotyledonen lange behielten. Da aber gerade mit Markierungsversuchen die Source-Sink-Beziehungen in der Pflanze gut untersucht werden können, wurde es nötig, einen Termin festzulegen, an dem die Kotyledonen an allen Versuchspflanzen entfernt wurden. In den folgenden Versuchen wurden deshalb die Kotyledonen 3 d vor dem Versuchstermin entfernt.

4.3.1 Nitrataufnahmekinetiken von Raps (^{13}N -Influx) bei geringem N-Angebot

Die Nitrataufnahme höherer Pflanzen unterliegt zahlreichen Regelmechanismen, deren Funktionsweise erst bei Induktions- oder Re-Induktionsversuchen verständlich wird. In der Literatur sind zwei unterschiedliche Nitrat-Aufnahmesysteme beschrieben worden, von denen das Erste im Bereich niedriger Nitrat-Konzentrationen arbeitet (**Lee** und **Drew**, 1986; **Siddiqi** et al, 1990; **Watt** et al, 1993). Von diesem Aufnahmesystem wurde berichtet, dass es durch NO_3^- induzierbar und bereits durch geringe Mengen von Ammonium gehemmt wird (**Lee** et al, 1989).

Mit $^{13}\text{NO}_3^-$ Influxversuchen wurden in der vorliegenden Arbeit Daten zur Charakterisierung der Leistung der Nitrataufnahme dieses Aufnahmesystems gesammelt. Zur Erstellung von Nitrataufnahme-Kinetiken wurden induzierte ($100 \mu\text{M NO}_3^-$) und nicht induzierte ($100 \mu\text{M NH}_4^+$) Pflanzen angezogen. Um sicherzustellen, dass sich am Versuchstermin alle Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium befinden, erfolgte die Anzucht in einem Anzuchtbecken, dessen NO_3^- -Konzentration auf $100 \mu\text{M}$ eingestellt wurde. Durch diese Vorbehandlung war außerdem auszuschließen, dass sich die Versuchspflanzen in unterschiedlichen physiologischen Zuständen befanden,

da alle während der Anzucht denselben klimatischen Schwankungen (Licht, Feuchte, Temperatur) ausgesetzt waren. Die Pflanzensets (je 3 Pflanzen pro Set) aus der Anzucht mit NH_4^+ wurden eine Stunde vor Versuchsbeginn auf eine Nährlösung ohne Stickstoff umgesetzt, um die hemmende Wirkung von NH_4^+ auf die Nitrataufnahme in den Wurzeln abklingen zu lassen.

Zu Versuchsbeginn wurden die Pflanzen für 1 min auf 0,5 mM CaSO_4 gesetzt und die Wurzeln anschließend mit 0,5 mM CaSO_4 kurz abgespült. Danach wurden die Pflanzen auf belüftete Markierungsgefäße umgesetzt, deren Nitratgehalte zwischen 10 μM und 250 μM lagen. Nach 15 min Aufnahmeperiode wurde die Markierung beendet. Die Pflanzen wurden von den Markierungsgefäßen entfernt und die den Wurzeln anhaftende radioaktive Nährlösung in bereitstehenden Gefäßen mit 0,5 mM CaSO_4 abgespült. Anschließend wurden die Pflanzen in Spross und Wurzel getrennt und die Wurzeln vorsichtig mit Zellstoff-Tüchern abgetrocknet. Nach dem Einbringen der Pflanzenfraktionen in Probenflaschen erfolgte im γ - Counter die Bestimmung der ^{13}N -Gehalte der Fraktionen. Aus der spezifischen ^{13}N -Aktivität der Nährlösung, den ^{13}N -

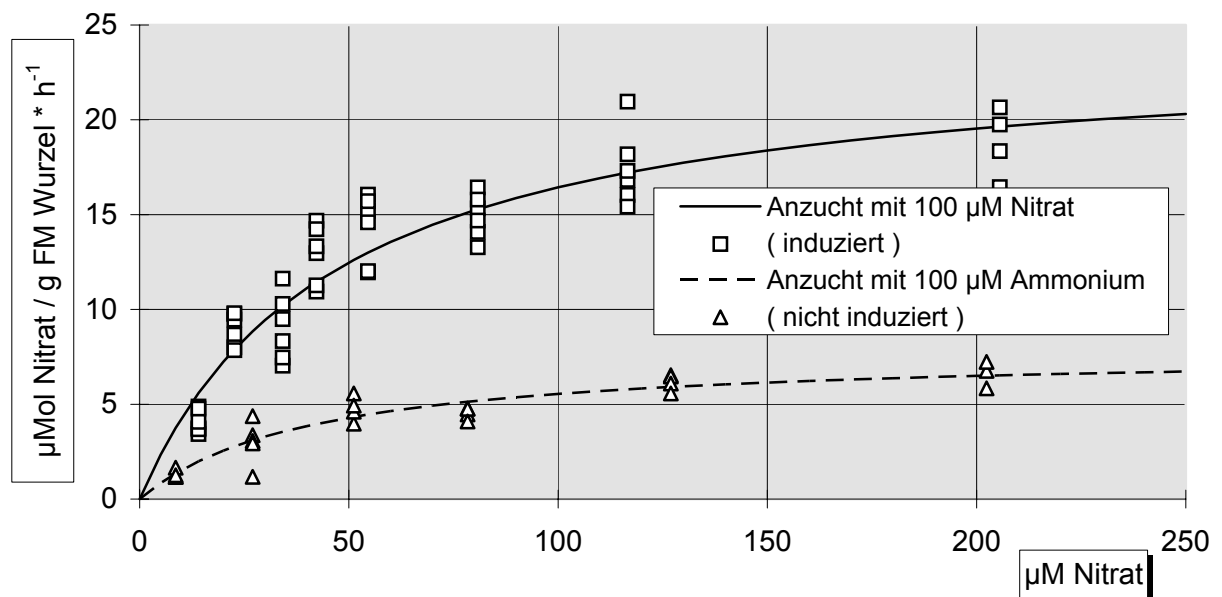


Abbildung 14: Induktion der Nitrataufnahme bei *Brassica napus* L.. Die eingezeichneten Aufnahmekurven wurden mit einer *curve-fit* Routine berechnet.

Die induzierten Pflanzen zeigen mit $V_{\max} = 23,9 \mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}^{-1}$ und $K_M = 44,4 \mu\text{Mol NO}_3^-$ eine höhere Aufnahmerate in Verbindung mit einer geringeren Substrataffinität als die nicht induzierten Pflanzen ($V_{\max} = 7,5 \mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}^{-1}$, $K_M = 34,9 \mu\text{Mol NO}_3^-$). Jeder Messwert stellt die Aufnahme von 3 Einzelpflanzen dar.

Gehalten der Pflanzen und der Wurzelmasse wurden, unter Berücksichtigung einer Zerfallskorrektur (Halbwertszeit des $^{13}\text{N} = 9,97 \text{ min}$), daraufhin die Aufnahme­raten der Einzelpflanzen errechnet. Ein Vergleich der Aufnahme­raten der NO_3^- -ernährten (induzierten) Rapspflanzen mit denen der NH_4^+ -Variante (nicht induziert) zeigt, dass die Nitrataufnahme der induzierten Pflanzen ca. 3 mal höher ist als bei der nicht induzierten Variante (Abbildung 14).

Aus den Messwerten des γ - Counter wurden mit Hilfe eines *Curve-Fit* Algorithmus (SIGMA PLOT, Jandel Scientific) die Parameter der Nitrataufnahme K_M und V_{\max} bestimmt. Neben der Formel von Michaelis-Menten (Tabelle 14, Gleichung 15) wurden für den *curve-fit* noch drei weitere Formeln verwendet, welche die ursprüngliche Gleichung durch Transformationen in eine Geradengleichung umwandeln.

Die zur Berechnung der Parameter V_{\max} und K_M verwendeten Formeln aus Tabelle 14 haben unterschiedliche Vor- und Nachteile und lassen auf verschiedene Arten die gesuchten Aufnahmegrößen bestimmen:

- Die Formel von Michaelis-Menten (Gleichung 15) erlaubt zwar nicht, die Aufnahmeparameter grafisch zu ermitteln, jedoch bietet sie mit einer Auftragung der Aufnahme­rate (v) gegen das Nitratangebot (C) die anschaulichste Form zur Darstellung der Einzelmesswerte in Kombination mit der errechneten Aufnahmekinetik.
- Nach der Gleichung von Lineweaver-Burk (Gleichung 16) werden die Kehrwerte der Aufnahme­raten ($1/v$) gegen die Kehrwerte des Nitratangebotes ($1/C$) aufgetragen und so eine Geradengleichung erzielt. Der Schnittpunkt mit der Ordinate liegt bei $1/V_{\max}$ und der Schnittpunkt mit der Abszisse ist $1/K_M$.
- Bei der Formel von Eadie-Hofstee (Gleichung 17) erfolgt die Auftragung der Aufnahme­raten (v) gegen den Quotienten aus Aufnahme­rate und Nitratangebot (v/C). Hierbei ergibt sich V_{\max} als der Schnittpunkt mit der Ordinate und V_{\max}/K_M als Schnittpunkt mit der Abszisse.
- Im Hanes-Plot wird der Quotient von Nitratangebot und Aufnahme­rate (C/v) gegen die Nitratkonzentration (C) aufgetragen. Eine nach der Gleichung 18 aufgetragene Gerade schneidet dann die Abszisse in K_M/v und die Ordinate in $-K_M$.

Im Vergleich der errechneten Aufnahmeparameter (Tabelle 15) fällt auf, dass bei der Berechnung nach Lineweaver-Burk höhere Werte für K_M und V_{\max} ermittelt werden als in den anderen Gleichungen. Zwar liegen die Abweichungen zur Ausgleichsgeraden hier nicht wesentlich über den Werten der anderen Berechnungen, doch es ergeben sich begründete Zweifel an der Zuverlässigkeit dieser Werte. Aufgrund der geringeren Streuung der Messwerte bei der NH_4^+ -Variante sind dort die Abweichungen von der

<u>Gleichungen zur Berechnung der Nitrataufnahmeraten</u>		
Gleichung 15	Michaelis - Menten Gleichung	$v = V_{\max} \cdot \frac{C}{C + K_M}$
Gleichung 16	Lineweaver - Burk Gleichung	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{C}$
Gleichung 17	Eadie - Hofstee Gleichung	$v = V_{\max} - K_M \cdot \frac{v}{C}$
Gleichung 18	Hanes - Gleichung	$\frac{C}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{1}{v} \cdot C$
<u>Variablendefinition</u>		
v	Nitrataufnahmerate bei vorgegebenem Nitratangebot (angegeben in $\mu\text{Mol Nitrat} / \text{g FM Wurzel h}^{-1}$)	
V_{\max}	Aufnahmerate bei optimaler Ausnutzung aller Carrier des Aufnahmesystems	
C	angebotene Nitratkonzentration (in $\mu\text{Mol Nitrat}$)	
K_M	Affinität des Enzyms zu seinem Substrat. Hier gibt K_M die Nitratkonzentration der Nährlösung an, bei der 50 % der maximalen Aufnahmerate erreicht werden.	

Tabelle 14: Formeln zur Berechnung der Parameter K_M und V_{\max} der Nitrataufnahme. Die Formeln basieren auf den Reaktionsgleichungen für eine Reaktion erster Ordnung, die von Michaelis-Menten (Gleichung 15) zur Charakterisierung der katalytischen Aktivität von Enzymen aufgestellt wurde. Bei der Anwendung dieser Gleichung auf Tunnelproteine oder Carrier wird hier mit den Parametern K_M die Affinität des Transportproteins zu seinem Substrat (NO_3^-) und mit V_{\max} die maximale Aufnahmerate beschrieben (nach **Karlson**, 1984).

Ausgleichsgeraden deutlich geringer, aber auch hier liegen die Werte von K_M und V_{max} deutlich über denen der anderen Berechnungen.

Die Gleichung von Eadie-Hofstee liefert Aufnahmeparameter, die sowohl bei der NO_3^- -Variante als auch bei der NH_4^+ -Variante unter denen der anderen Berechnungen liegen. Hinzu kommen hohe Abweichungen von der errechneten Ausgleichsgeraden, die auch diese Werte als nicht sicher erscheinen lassen.

Mit dem Hanes-Plot und der Berechnung an Hand der Formel von Michaelis-Menten lassen sich die zuverlässigsten Werte errechnen (Tabelle 15). Mit Aufnahmeraten von 24,09 bzw. 23,89 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$ für die induzierten Pflanzen und 7,84 bzw. 7,50 $\mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$ für die nicht-induzierten Pflanzen liegen die Aufnahmeraten in diesen Berechnungen in einem engen Bereich. Leichte Unterschiede ergeben sich hingegen bei der Berechnung der K_M -Werte, die mit 49,5 bzw. 44,4 $\mu\text{Mol NO}_3^-$ bei der Nitratvariante und 41,4 bzw. 34,9 $\mu\text{Mol NO}_3^-$ bei der Ammonium-Variante angegeben werden. Es kann jedoch festgehalten werden, dass die K_M -Werte

Tabelle 15: Liste der berechneten Parameter der Nitrataufnahme von *Brassica napus* L., die nach verschiedenen Formeln (vgl. Tabelle 14) über eine *curve-fit* Routine berechnet wurden. Neben der Affinität der Transportproteine zu ihrem Substrat (K_M) und der maximalen Aufnahmerate (V_{max}) ist der Korrelationskoeffizient (r^2) zwischen Messwerten und den errechneten Ausgleichskurven angegeben. Die Daten im oberen Teil der Tabelle beziehen sich auf *Nitrat-induzierte* Pflanzen, während im unteren Teil die Werte *nicht-induzierter* Pflanzen dargestellt sind.

induziert NO_3^- -ernährt	V_{max}	K_M	r^2
Lineweaver-Burk	42,93	122,81	0,9274
Eadie-Hofstee	19,09	27,79	-0,5811
Hanes	24,09	49,54	0,9526
Michaelis-Menten	23,89	44,39	(0,7959)
nicht-induziert NH_4^+ -ernährt	V_{max}	K_M	r^2
Lineweaver-Burk	8,51	47,67	0,8797
Eadie-Hofstee	6,91	29,88	-0,6757
Hanes	7,84	41,40	0,9106
Michaelis-Menten	7,50	34,93	(0,8457)

der NH_4^+ -Variante bei allen Berechnungen unter denen der NO_3^- -Variante liegen und somit bei der Anzucht mit NH_4^+ eine höhere Affinität des Aufnahmesystems zum Substrat NO_3^- vorliegt.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss einer mehrstündigen Mangelperiode bei der Umstellung der Ernährung von Ammonium auf Nitrat untersucht. Die mit $100 \mu\text{M}$ NH_4^+ angezogenen Pflanzen wurden dazu 6 h bzw. 24 h vor der Markierung auf ein Medium ohne Stickstoff gesetzt (Abbildung 15). Parallel hierzu sollte festgestellt werden, in welchem Maß sich die Nitrataufnahme durch einen kurzfristigen Kontakt mit Nitrat steigern lässt. Dazu wurde einigen Pflanzen vor Beginn der Mangelperiode über 1 h ein NO_3^- -Puls ($100 \mu\text{M}$) gegeben. Bis zum Beginn der ^{13}N -Applikation waren die Pflanzen somit 1 h, 6 h bzw. 24 h N-Mangel ausgesetzt.

Je länger die nicht-induzierten Pflanzen auf dem Mangelmedium blieben, desto höher war die maximale Aufnahmerate, die sie beim zweiten Kontakt mit Nitrat zeigten (Tabelle 16). So stieg die Aufnahmerate von $7,5 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ nach 1 h auf dem N-freien Medium auf $7,9 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ nach 6 h, bzw. auf $8,4 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ nach 24 h N-Mangel an. Da wiederholt gezeigt wurde, dass Ammonium die Nitrataufnahme hemmt (Lee, 1989; King, 1993; Cruz, 1993; Botella, 1994; Saravitz, 1994), kann diese Beobachtung als ein langsames Abklingen der Inhibition der Nitrataufnahme nach Ammonium-Ernährung gedeutet werden.

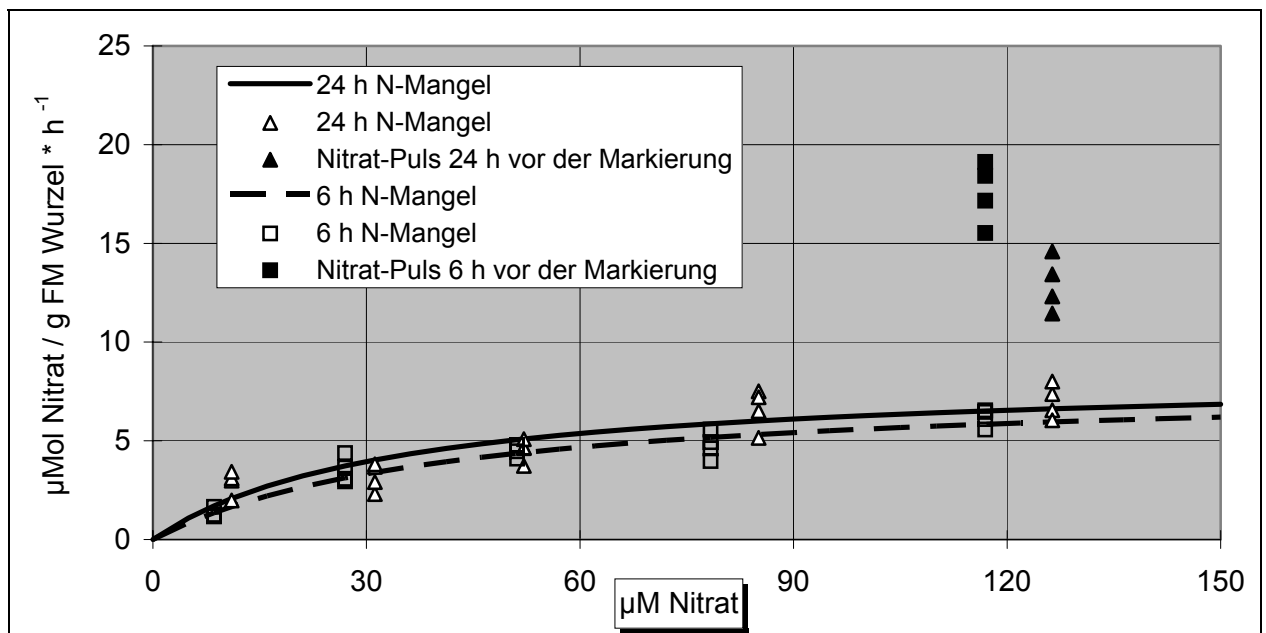


Abbildung 15: Auswirkungen von N-Mangel und eines 1 h Nitrat-Pulses auf die Induktion der Nitrataufnahme von Ammonium-ernährten Rapspflanzen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 Versuchspflanzen dar.

Tabelle 16: Änderungen von K_M und v_{max} von Rapspflanzen, die nach NH_4 -Ernährung für 1 h einen Nitrat-Puls (100 μM) erhielten und dann für 1 h bis 24 h auf ein Medium ohne Stickstoff umgesetzt wurden.

	V_{max}	K_M
1 h N-freies Medium	7,5 $\mu Mol\ NO_3^- / g\ FM\ h^{-1}$	34,9 $\mu M\ NO_3^-$
6 h N-freies Medium	7,9 $\mu Mol\ NO_3^- / g\ FM\ h^{-1}$	41,5 $\mu M\ NO_3^-$
24 h N-freies Medium	8,4 $\mu Mol\ NO_3^- / g\ FM\ h^{-1}$	33,7 $\mu M\ NO_3^-$

Ein Trend bei der Affinität des Aufnahmesystems zu Nitrat war nicht zu erkennen, denn der Wert von K_M stieg zwar anfangs von 34,9 auf 41,5 $\mu M\ NO_3^-$ (6 h ohne N) an, fiel aber dann wieder auf 33,7 $\mu M\ NO_3^-$ ab (Tabelle 16). Die Annahme, dass mit längerem Verbleib der Pflanzen auf einem N-Mangelmedium auch die Affinität der Nitrataufnahme steigt, kann mit diesen Werten folglich nicht gestützt werden.

Auf einen 1 h Nitrat-Puls vor dem Beginn des N-Mangels reagierten die Rapspflanzen mit einer deutlichen Steigerung der Aufnahme (Abbildung 15). Bei den Pflanzen, die 24 h N-Mangel erfahren hatten, stieg die Aufnahme bei einem NO_3^- -Angebot von 126 $\mu M\ l^{-1}$ von 6,9 auf 12,9 $\mu Mol\ NO_3^- / g\ FM\ h^{-1}$ (+ 87 %). Stärker noch war der Effekt bei den Pflanzen, die nur 6 h auf dem Mangelmedium verbracht hatten. Bei dieser Variante war bei einem Nitratangebot von 116 $\mu M\ l^{-1}$ ein Anstieg der Aufnahme von 6,2 auf 12,9 $\mu Mol\ NO_3^- / g\ FM\ h^{-1}$ (+ 108 %) zu beobachten.

Die Steigerung der Nitrataufnahme nicht-induzierter Rapspflanzen durch einen NO_3^- -Puls ist offensichtlich reversibel, denn bei einem längeren Verbleib der Pflanzen auf dem N-Mangelmedium ist ein Rückgang der Aufnahmeraten festzustellen (Abbildung 15).

4.3.2 Nitrataufnahmekinetiken von Raps (^{13}N -Influx) bei hohem N-Angebot

Neben dem HATS, das bei geringem Nährstoffangebot die Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen gewährleistet, existiert aber noch ein weiteres Aufnahmesystem. Dieses zweite Aufnahmesystem setzt erst bei höherem Nährstoffangebot ein und wird auch als LATS bezeichnet.

Zur Ermittlung der charakteristischen Aufnahmeparameter dieses Systems wurden Pflanzen auf einer Nährlösung mit 2 mM NO_3^- angezogen. Zu Versuchsbeginn wurden

die Pflanzen dann auf Nährlösungen umgesetzt, deren Nitratkonzentration im Bereich von 0,5 mM bis 25 mM lag. Die Bestimmung der Aufnahmeraten erfolgte auch hier unter Einsatz von $^{13}\text{NO}_3^-$ unter denselben Versuchsbedingungen, wie sie für die Untersuchungen im niedrigen Konzentrationsbereich vorgenommen wurden. Bei einem hohen Nitratangebot folgt die Nitrataufnahme nicht mehr der Gleichung von Michaelis-Menten, sondern einer Geradengleichung. Während bei niedrigem Angebot die Nitrataufnahme von Carriern übernommen wird, wird bei hohem Angebot die Aufnahme von Tunnelproteinen übernommen, die im Gegensatz zu den Carriern kein ATP verbrauchen. Der Übergang vom einen zum anderen Aufnahmesystem ist fließend und abhängig von der verwendeten Versuchspflanze sowie der Ernährung der Pflanze. So gaben **Siddiqi et al. (1993)** nach ihren Untersuchungen an Gerste für den Übergang der Nitrataufnahme vom HATS zum LATS einen Bereich von 300 μM bei nicht-induzierten und 1000 μM Nitrat bei induzierten Pflanzen an.

Für *Chlamydomonas* gaben **Watt et al. (1993)** ebenfalls ein biphasisches Verhalten der Nitrataufnahme an. Bei ihren Untersuchungen erfolgte der Übergang zum LATS ähnlich der induzierten Gerste bei 1000 bis 1200 μM Nitrat, jedoch schloss sich bei

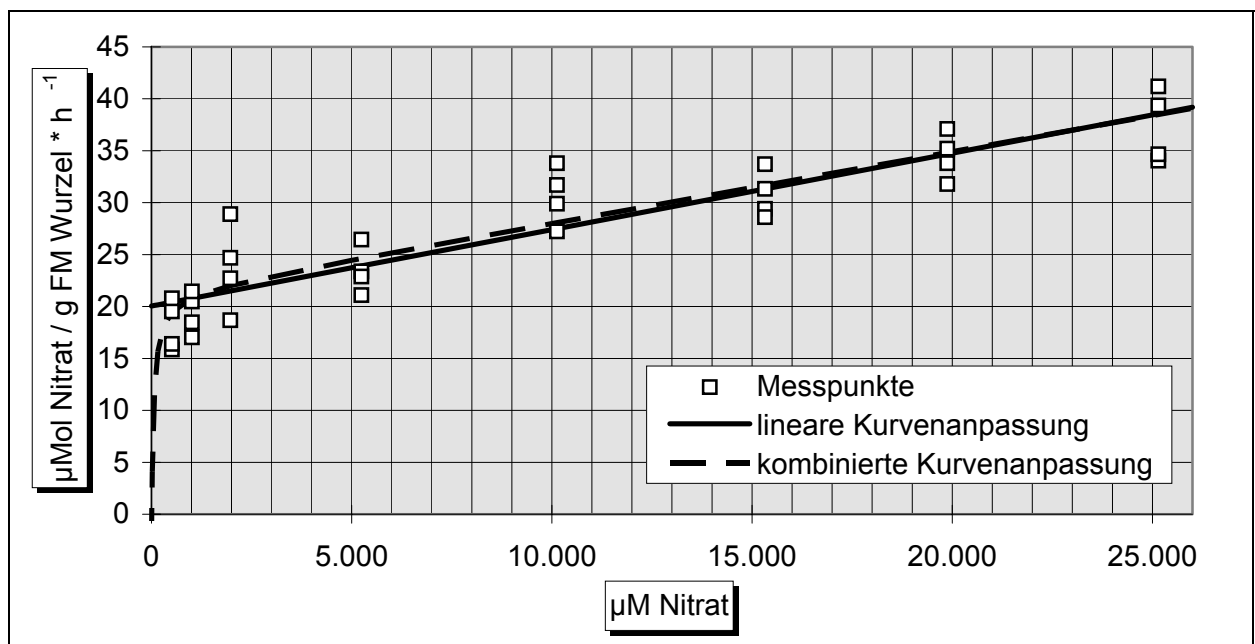


Abbildung 16: Nitrataufnahme von Rapspflanzen bei hohem Nitratangebot. Von den beiden Kurvenanpassungen wurde eine nach einer Geradengleichung (Tabelle 17, Gleichung 4.5), die andere nach einer Geradengleichung unter Berücksichtigung der Michaelis-Menten Kinetik für geringes Nitrat-Angebot (Tabelle 17, Gleichung 4.6) errechnet. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 Einzelpflanzen dar.

Chlamydomonas keine lineare Aufnahme an. Es wurde stattdessen ein weiteres, der Gleichung von Michaelis-Menten folgendes Aufnahmesystem festgestellt.

Vor der Kalkulation der Parameter der Nitrataufnahme bei hohem Angebot war nicht bekannt, bei welchem Nitratangebot die Nitrataufnahme von Rapspflanzen vom HATS zum LATS übergeht. Ziel der Versuchsreihe war es jedoch nicht, diesen Bereich durch eine Vielzahl von Messpunkten genau zu bestimmen. Es stellte sich vielmehr die Frage, mit welcher Rate die Nitrataufnahme von Brassica napus bei hohem Nitratangebot erfolgt. Für die folgenden Berechnungen wurde daher zunächst eine lineare Beziehung von Nitratangebot und Nitrataufnahme (Tabelle 17, Gleichung 19) zugrunde gelegt. Um bei geringerem Angebot dem Einfluss des HATS auf die Aufnahme rate gerecht zu werden, wurde die Nitrataufnahme zusätzlich noch nach einer aus Michaelis-Menten-Kinetik und einer Geradengleichung kombinierten Formel (Gleichung 20) berechnet. Die Unterschiede im Ordinatenabschnitt (b) der beiden Berechnungen sind an dieser Stelle nicht von Bedeutung, wohl aber die Abweichungen der Messwerte von den errechneten Kurven (r^2) sowie die Steigung der Kurven (m). Wie sich aus Abbildung 16

Tabelle 17: Geradengleichungen zur Berechnung der Nitrataufnahme bei hohem Nitratangebot. In die untere Gleichung wurden die Parameter des Aufnahmesystems bei geringem Nitratangebot (Michaelis-Menten Kinetik) aufgenommen.

Gleichung 19 $v = m \cdot C + b$

Gleichung 20 $v = m \cdot C + b + V_{MAX} \cdot \frac{K_M}{K_M + C}$

v Aufnahme rate in $\mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}^{-1}$

C Nitratangebot in der Nährlösung in $\mu\text{Mol / l}$

m Korrelationskoeffizient (Steigung der Geraden)

b Achsenabschnitt

K_M Nitratkonzentration, bei der das im niedrigen Konzentrationsbereich aktive Aufnahmesystem 50 % der maximalen Aufnahme rate erreicht

V_{max} maximale Aufnahme rate des Aufnahmesystems bei niedrigem NO_3^- -Angebot

entnehmen lässt, unterscheiden sich die nach Gleichung 19 bzw. Gleichung 20 errechneten Aufnahmekurven nur geringfügig und laufen bei hohem Nitratangebot weitgehend parallel. Bei einem Angebot von 0,5 bis 1,0 mM Nitrat kommt die kombinierte Gleichung den Messwerten jedoch deutlich näher als die Geradengleichung.

Tabelle 18: Berechnung der Nitrataufnahme von *Brassica napus* bei hohem Nitratangebot. In der „kombinierten Gleichung“ erfolgte die Kurvenanpassung nach Gleichung 20 mit den Parametern des Aufnahmesystems bei geringem Angebot ($V_{\max} = 23,89 \mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$; $K_M = 44,39 \mu\text{Mol Nitrat} / \text{l}$). Mit r^2 sind die Korrelationskoeffizienten zwischen den Einzelmesswerten und der errechneten Geraden (Steigung = m, Achsenabschnitt = b) angegeben. In die Berechnungen der oberen Tabelle gingen alle Messwerte (0,5 - 25 mM Nitratangebot) ein, während in der mittleren und unteren Tabelle nur die Messwerte ab 1,0 mM bzw. 2,0 mM Nitrat berücksichtigt wurden.

0,5 –25 mM Nitrat	m	$[\frac{1}{\text{g FM} \cdot \text{h}}]$	b	$[\frac{1}{\text{g FM} \cdot \text{h}}]$	r^2
lineare Gleichung	0,736	$\cdot 10^{-3}$	20,05		0,820
kombinierte Gleichung	0,688	$\cdot 10^{-3}$	-2,86		0,839
1.0 -25 mM Nitrat	m	$[\frac{1}{\text{g FM} \cdot \text{h}}]$	b	$[\frac{1}{\text{g FM} \cdot \text{h}}]$	r^2
lineare Gleichung	0,688	$\cdot 10^{-3}$	20,92		0,798
kombinierte Gleichung	0,660	$\cdot 10^{-3}$	-2,35		0,807
2.0 -25 mM Nitrat	m	$[\frac{1}{\text{g FM} \cdot \text{h}}]$	b	$[\frac{1}{\text{g FM} \cdot \text{h}}]$	r^2
lineare Gleichung	0,620	$\cdot 10^{-3}$	22,21		0,747
kombinierte Gleichung	0,604	$\cdot 10^{-3}$	-1,29		0,746

4.3.3 Nitrataufnahmekinetiken von Lupinen (^{13}N -Influx)

Unter denselben Versuchsbedingungen, wie sie bereits für Raps beschrieben wurden, wurde auch für Lupinen eine Nitrat-Aufnahmekinetik erstellt, bei der das Isotop ^{13}N zum Einsatz kam. Die Aufnahmeparameter wurden auch hier nach den in Tabelle 14 dargestellten Formeln berechnet (Tabelle 19) und die Zuverlässigkeit der errechneten Daten verglichen.

Wegen einer geringeren Schwankungsbreite der Einzelmesswerte bei der Lupine ergaben sich nur geringe Abweichungen zwischen den verwendeten Formeln, was für eine gute Absicherung der berechneten Werte von K_M und V_{\max} spricht.

Mit einer V_{\max} von $0,4 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ liegt die Aufnahme rate der nicht-induzierten Pflanzen bei ca. 11 % der Aufnahme rate der Nitrat-ernährten Variante ($V_{\max} = 3,7 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$). Bei einem K_M -Wert von $12 \mu\text{M}$ Nitrat ist die Affinität des Aufnahmesystems bei den nicht induzierten Pflanzen allerdings 2.5-mal höher als bei den induzierten Lupinen ($K_M = 30,6 \mu\text{M}$ Nitrat).

Die Lupine zeigte deutlich geringere Aufnahme rates (Abbildung 17) als Raps (Abbildung 16), der unter gleichen Bedingungen angezogen wurde. Die Nitrataufnahme rate der induzierten Lupinen lag mit ca. $3,7 \mu\text{Mol}/\text{g FM h}^{-1}$ um 85 % unter der Aufnahme rate der induzierten Rapspflanzen. Noch größer war der

Tabelle 19: Nach den Formeln in Tabelle 14 berechnete Parameter der Nitrataufnahme von **Lupinus albus**. Die im oberen Teil der Tabelle dargestellten Daten stammen von Pflanzen mit NO_3^- als alleiniger N-Quelle, während die unteren Daten von Pflanzen mit NH_4^+ als N-Quelle stammen.

induziert NO_3^- -Medium	V_{\max}	K_M	r^2
Lineweaver-Burk	$3,78 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$32,10 \mu\text{M NO}_3^-$	0,989
Eadie-Hofstee	$3,68 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$29,77 \mu\text{M NO}_3^-$	- 0,935
Hanes	$3,70 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$30,67 \mu\text{M NO}_3^-$	0,988
Michaelis-Menten	$3,73 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$30,59 \mu\text{M NO}_3^-$	0,894
nicht-induziert NH_4^+ -Medium	V_{\max}	K_M	r^2
Lineweaver-Burk	$0,39 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$9,03 \mu\text{M NO}_3^-$	0,774
Eadie-Hofstee	$0,40 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$9,38 \mu\text{M NO}_3^-$	- 0,652
Hanes	$0,45 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$21,78 \mu\text{M NO}_3^-$	0,967
Michaelis-Menten	$0,41 \mu\text{Mol NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$	$12,45 \mu\text{M NO}_3^-$	0,883

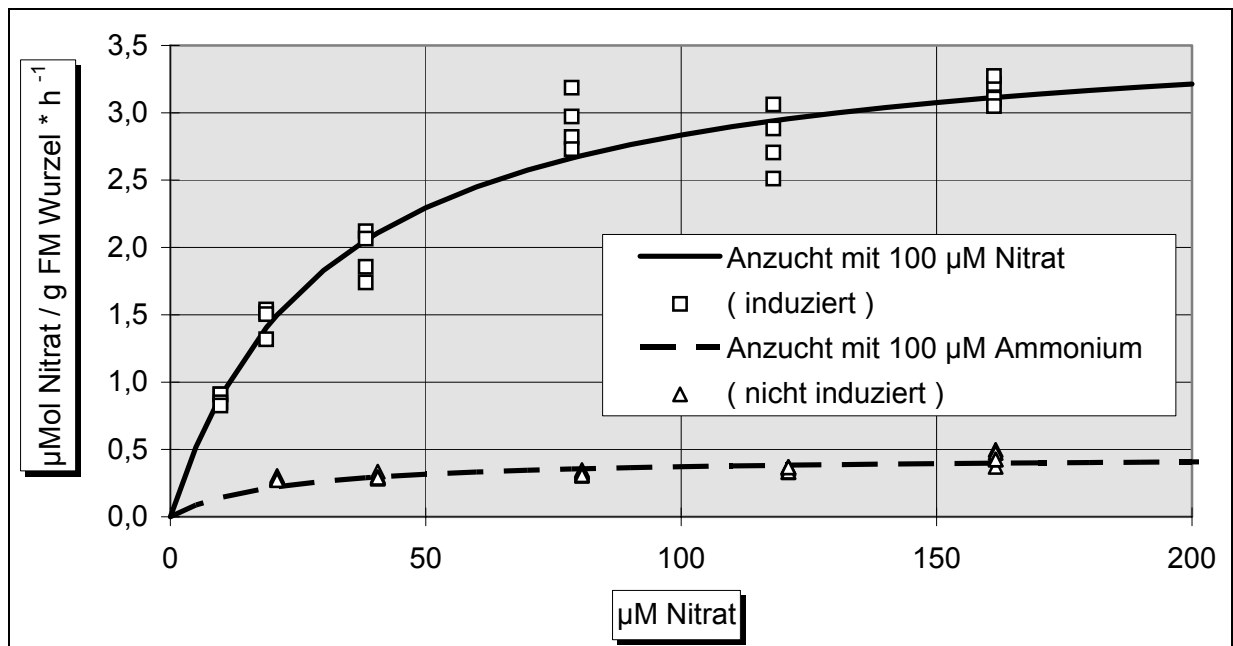


Abbildung 17: Nitrataufnahmekinetik von induzierten und nicht-induzierten 25 d alten **Lupinen** (*Lupinus albus* L. cv. AMIGA) bei geringem N-Angebot. Die Kurven wurden auf der Basis der Gleichungen der Michaelis-Menten Kinetik errechnet. Jeder Messpunkt steht für die Aufnahmerate von 3 Lupinen.

Unterschied bei den Aufnahmeraten der nicht-induzierten Pflanzen, wo die Lupine mit $0,4 \mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$ um 95 % unter dem für Raps ermittelten Wert lag.

4.3.4 Nitrataufnahmekinetiken von Lupinen (^{13}N -Influx) bei hohem NO_3^- -Angebot

Wie bereits bei Raps (S.68), so wurde auch an Lupinen die Nitrataufnahme bei hohem Angebot untersucht. Bei einem Angebot von $> 1 \text{ mM}$ Nitrat folgt die Nitrataufnahme auch bei *Lupinus albus* L. einer linearen Gleichung (Abbildung 18). Ähnlich wie bei Raps war auch hier bei der Steigerung des Nitratangebotes von 1 mM auf 25 mM eine Verdoppelung der Aufnahmerate festzustellen. Während bei *Brassica napus* L. die Nitrataufnahme beim genannten Nitratangebot von $19,5$ auf $37,3 \mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$ zunahm (Abbildung 16), fiel die absolute Steigerung der Aufnahmerate von *Lupinus albus* L. von $3,0$ auf $5,8 \mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$ jedoch deutlich niedriger aus (Abbildung 18). Die hohen Korrelationskoeffizienten in Tabelle 20 belegen eine sehr gute Übereinstimmung der Messwerte mit den errechneten Geradengleichungen. Werden Messwerte des geringen Nitratangebotes bei der Berechnung weggelassen, so nimmt der Korrelationskoeffizient für die kombinierte Gleichung stärker ab als derjenige für die

lineare Gleichung. Bei einem Angebot von 2 mM Nitrat hat r^2 für beide Gleichungssysteme denselben Wert, was darauf hinweist, dass ab diesem Nitratangebot die Nitrataufnahme nicht mehr besser durch die kombinierte Gleichung beschrieben werden kann.

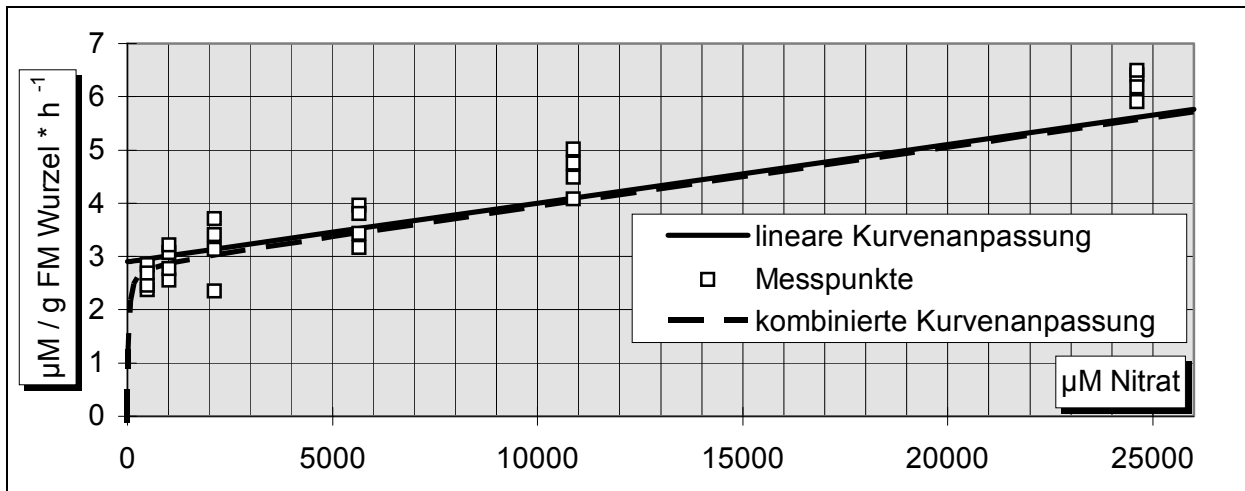


Abbildung 18: Nitrataufnahme von 23 d alten **Lupinen** bei hohem NO_3^- -Angebot. Die Grafen wurden nach den Geradengleichung (Tabelle 17, Gleichung 19 und Gleichung 20) erstellt. Jeder Messpunkt entspricht der Aufnahme rate von einem Set aus 3 Lupinen.

Tabelle 20: Berechnung der Nitrataufnahme von **Lupinus albus L.** bei hohem Nitratangebot. Die Geradengleichungen aus Tabelle 17 wurden verwendet, um die Parameter m und b zu ermitteln. In die Berechnung der kombinierten Gleichung (Gleichung 20) gingen die Parameter des Aufnahmesystems bei geringem Angebot ($V_{\max} = 3,73 \text{ Mol / g FM h}^{-1}$ $K_M = 30,59 \text{ µMol NO}_3^- \text{ l}^{-1}$) mit in die Berechnung ein.

0,5 - 25 mM Nitrat		m	$[\text{1/g FM} \cdot \text{h}]$	b	$[\text{1/g FM} \cdot \text{h}]$	r^2
Lineare Gleichung		$0,117 \cdot 10^{-3}$		2,903		0,924
kombinierte Gleichung		$0,113 \cdot 10^{-3}$		-0,715		0,929
1,0 - 25 mM Nitrat		m	$[\text{1/g FM} \cdot \text{h}]$	b	$[\text{1/g FM} \cdot \text{h}]$	r^2
lineare Gleichung		$0,109 \cdot 10^{-3}$		3,048		0,919
kombinierte Gleichung		$0,106 \cdot 10^{-3}$		-0,614		0,920
2,0 - 25 mM Nitrat		m	$[\text{1/g FM} \cdot \text{h}]$	b	$[\text{1/g FM} \cdot \text{h}]$	r^2
lineare Gleichung		$0,099 \cdot 10^{-3}$		3,204		0,908
kombinierte Gleichung		$0,103 \cdot 10^{-3}$		-0,486		0,908

4.3.5 Transport von ^{13}N in Pflanzen

Mit Hilfe des Radioisotops ^{13}N wurde in Fluxstudien der Frage nachgegangen, wie sich die Nitrataufnahme von **Raps** bei der Umstellung der N-Ernährung von NH_4^+ auf NO_3^- ändert. Die in Abbildung 3 (S.30) dargestellte Anlage erlaubte neben der Messung der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme (Influx) auch die photometrische Bestimmung des Nitratgehaltes in der Nährlösung (Nettoaufnahme). Aus der Differenz dieser beiden Aufnahmeraten konnte somit der NO_3^- - Efflux errechnet werden.

4.3.6 Induktion der Nitrataufnahme nach vorangegangener Anzucht mit NH_4^+

Die bis zum Versuchstag mit $150\ \mu\text{M}\ \text{NH}_4^+$ ernährten Rapspflanzen zeigen beim ersten Kontakt mit NO_3^- bereits einen ^{13}N -Influx von $7,3\ \mu\text{Mol} / \text{g h}^{-1}$, was ca. 37,5 % des ^{13}N -Influx von Nitrat-ernährten Pflanzen ($18,4\ \mu\text{Mol} / \text{g h}^{-1}$, berechnet nach den Parametern der Nitrataufnahmekinetik für Raps (S. 65), entspricht. Direkt nach dem Umsetzen auf $150\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ verliefen Nitrat-Influx ($7,3\ \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$) und Nettoaufnahme ($7,0\ \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$) fast parallel und der Nitrat-Efflux betrug mit $0,3\ \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ nur 4 % des Influxes (Abbildung 19).

Die Versuchspflanzen wurden nach der ^{13}N -Markierung auf einem Medium, das $150\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ enthielt, belassen und **4 h** nach dem ersten Kontakt mit NO_3^- erneut für eine Flux-Studie eingesetzt. Der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Influx war zu diesem Zeitpunkt auf $29,6\ \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ angestiegen und lag somit bei ca. 161 % der Aufnahmerate von induzierten Pflanzen. Bei einem gleichzeitigen Anstieg der NO_3^- -Nettoaufnahme auf $27,4\ \mu\text{Mol/g h}^{-1}$ errechnet sich ein Efflux von $2,2\ \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$, der somit ca. 7,4 % des Influxes ausmacht (Abbildung 20).

Im weiteren Verlauf der Induktion der Nitrataufnahme war ein Absinken der Aufnahmeraten zu beobachten, wobei der Efflux zunahm (Abbildung 21). **20 h** nach der Induktion der NO_3^- -Aufnahme lag der $^{13}\text{NO}_3^-$ - Influx mit $21,1\ \mu\text{Mol/g h}^{-1}$ noch über dem Wert der Nitrat-ernährten Pflanzen (115 %), war jedoch schon deutlich gegenüber der 4 h nach der Induktion gemessenen Aufnahmerate abgesunken. Die NO_3^- -Nettoaufnahme ging auf $17,6\ \mu\text{Mol} / \text{g FM h}^{-1}$ zurück, so dass der Efflux nun mit $3,5\ \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ bereits 16,8 % der Nettoaufnahme ausmachte.

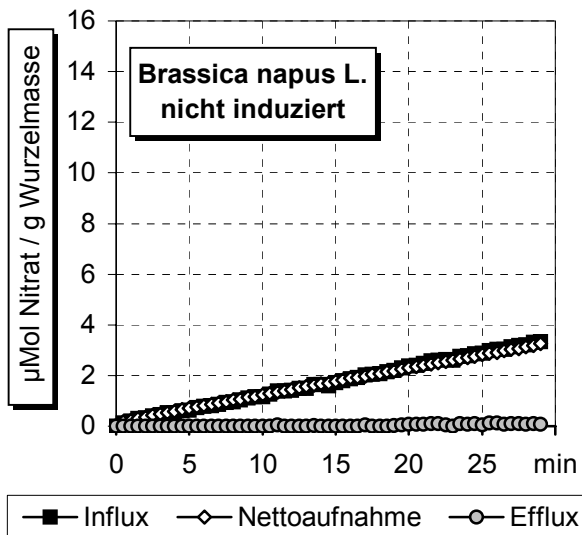


Abbildung 19: Induktion der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme bei nicht induzierten Rapspflanzen (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden mit $150\ \mu\text{M}$ NH_4^+ angezogen und zu Versuchsbeginn zum ersten Mal mit NO_3^- ernährt. (kumulative Darstellung).

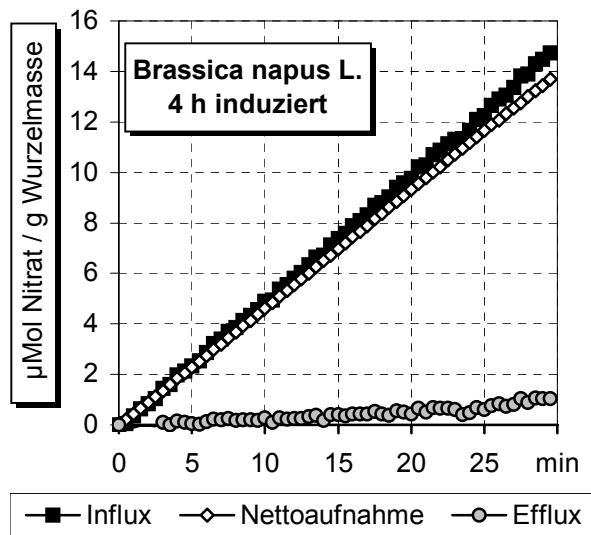


Abbildung 20: Entwicklung der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Fluxe von nicht induzierten Rapspflanzen (*Brassica napus* L.), die 4 h in Kontakt mit NO_3^- waren. Die Aufnahmeraten stammen von denselben Pflanzen, die in Abbildung 19 dargestellt sind.

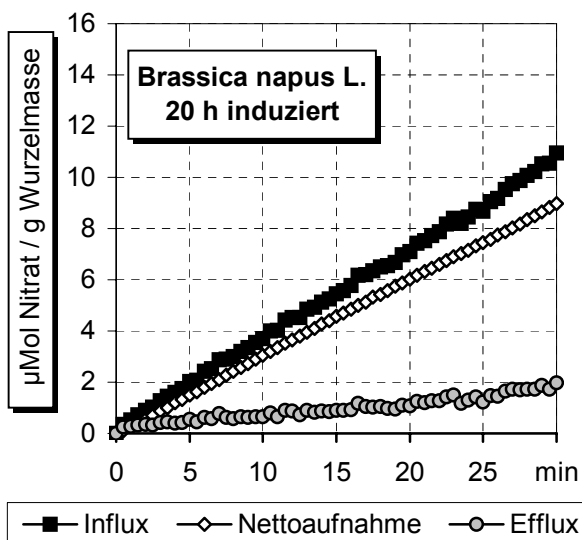


Abbildung 21: Auswirkungen der NO_3^- -Induktion der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von nicht induzierten Rapspflanzen (*Brassica napus* L.), die 20 h vor der Markierung von $150\ \mu\text{M}$ NH_4^+ auf $150\ \mu\text{M}$ NO_3^- umgestellt wurden.

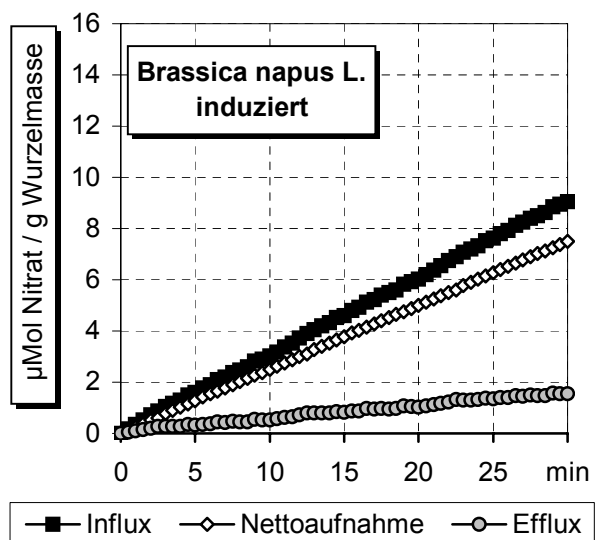


Abbildung 22: $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von induzierten Rapspflanzen (*Brassica napus* L.), die mit $150\ \mu\text{M}$ NO_3^- angezogen wurden.

Um einen direkten Vergleich zwischen Pflanzen im *steady state* (kontinuierliche Ernährung mit $150 \mu\text{M NO}_3^-$) und den Pflanzen bei der Induktion zu ermöglichen, wurde zu jeder Messung auch die Aufnahme von NO_3^- -ernährten Pflanzen bestimmt.

Bei den **induzierten** Pflanzen (Abbildung 22) lag der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Influx mit $18,1 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ etwas niedriger als der nach der Nitrat-Aufnahmekinetik ermittelte Wert ($18,4 \mu\text{Mol / g FM h}^{-1}$). Die NO_3^- -Nettoaufnahme betrug $15,0 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ und bei einem Efflux von $3,1 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ gingen den induzierten Pflanzen somit ca. 17,1% des ursprünglich aufgenommenen NO_3^- wieder verloren.

Die hier ermittelte Nitrataufnahme von Ammonium-ernährten Rapspflanzen liegt deutlich über den Werten, die normalerweise für nicht induzierte Pflanzen gefunden werden. Um einen Fehler bei der Anzucht der Pflanzen auszuschließen, wurden daher neben *Brassica napus L.* auch *Hordeum vulgare* (Wildtyp) und *Lupinus albus L.* in derselben Nährlösung angezogen. Wie in Abbildung 23a-c zu erkennen ist, zeigt keine der Versuchspflanzen einen Nitrat-Efflux beim ersten Kontakt mit nitrathaltiger Nährlösung. Dennoch liegt der Nitratinflux von *Brassica napus L.* mit $7,2 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ um den Faktor 3,5 über dem der Gerstenpflanzen ($1,6 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$) und fast um den Faktor 30 über dem Influx der Lupinen ($0,24 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$).

Nach 4 h auf Nitrat-haltigem Medium steigt der Nitratinflux bei allen 3 Pflanzen deutlich an (Abbildung 24) und es ist gleichzeitig ein schwacher Nitrat-Efflux zu beobachten. Mit $36 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ ist der Influx bei *Brassica napus L.* auf den 5-fachen Wert angestiegen, während *Hordeum vulgare* mit $6,5 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ den Influx lediglich auf den 4-fachen Wert steigerte. Die höchste relative Steigerung des Influx ist jedoch bei *Lupinus albus L.* zu verzeichnen, wo mit $4,8 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ der Nitratinflux auf den 22-fachen Wert der nicht induzierten Pflanzen ansteigt.

Werden die Pflanzen für 1 d in einer Nährlösung mit $150 \mu\text{M}$ Nitrat belassen (Abbildung 21), so fallen Nitratinflux und Nettoaufnahme deutlich ab und der Efflux nimmt geringfügig zu. Der Nitratinflux ging bei *Brassica napus L.* auf $18,5 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ (-48%), bei *Hordeum vulgare* auf $3,9 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ (-40%) und der von *Lupinus albus L.* auf $3,1 \mu\text{Mol/g FM h}^{-1}$ (-35%) zurück. Der Nitratinflux der 3 Pflanzenarten lag damit nur geringfügig über dem Influx bei kontinuierlich mit Nitrat angezogenen Pflanzen. Die induzierten Pflanzen wiesen zu diesem Zeitpunkt jedoch immer noch einen etwas geringeren Nitrat-Efflux auf, als er bei den kontinuierlich mit Nitrat ernährten Pflanzen zu beobachten war.

Ergebnisse

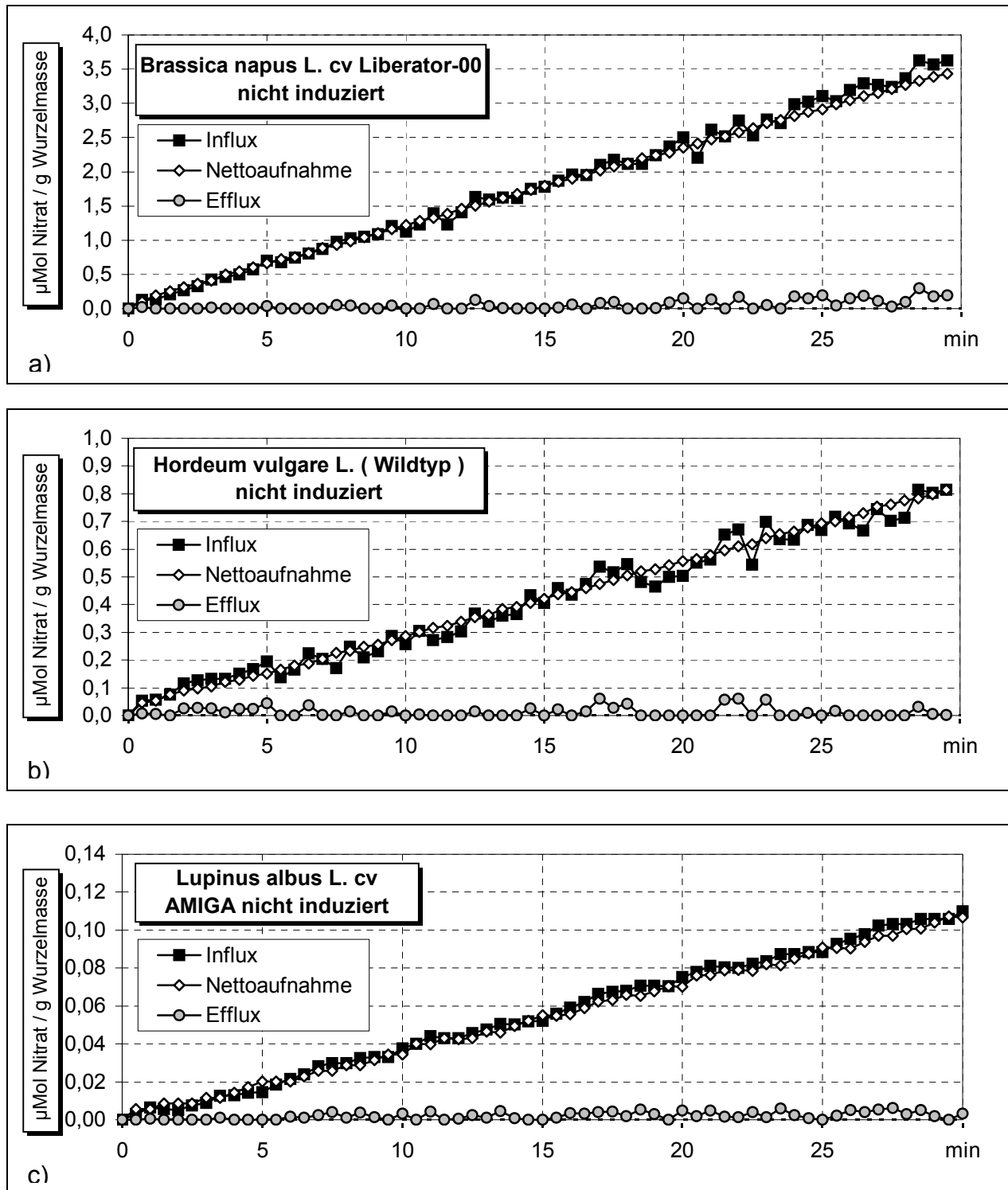


Abbildung 23a-c: Additive Raten der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von nicht induzierten **Rapspflanzen** (a), **Gerstenpflanzen** (b) und **Lupinen** (c) beim ersten Kontakt mit NO_3^- (Anzucht mit $150\ \mu\text{M}\ \text{NH}_4^+$). Zur Bestimmung der Aufnahmeraten wurden 4 Rapspflanzen (Alter 20 d), 6 Gerstenpflanzen (Alter 20 d) und 3 Lupinen (Alter 26 d) verwendet. Die Pflanzen wurden auf derselben Nährlösung angezogen und kamen am Versuchstag zum ersten Mal in Kontakt mit NO_3^- .

Ergebnisse

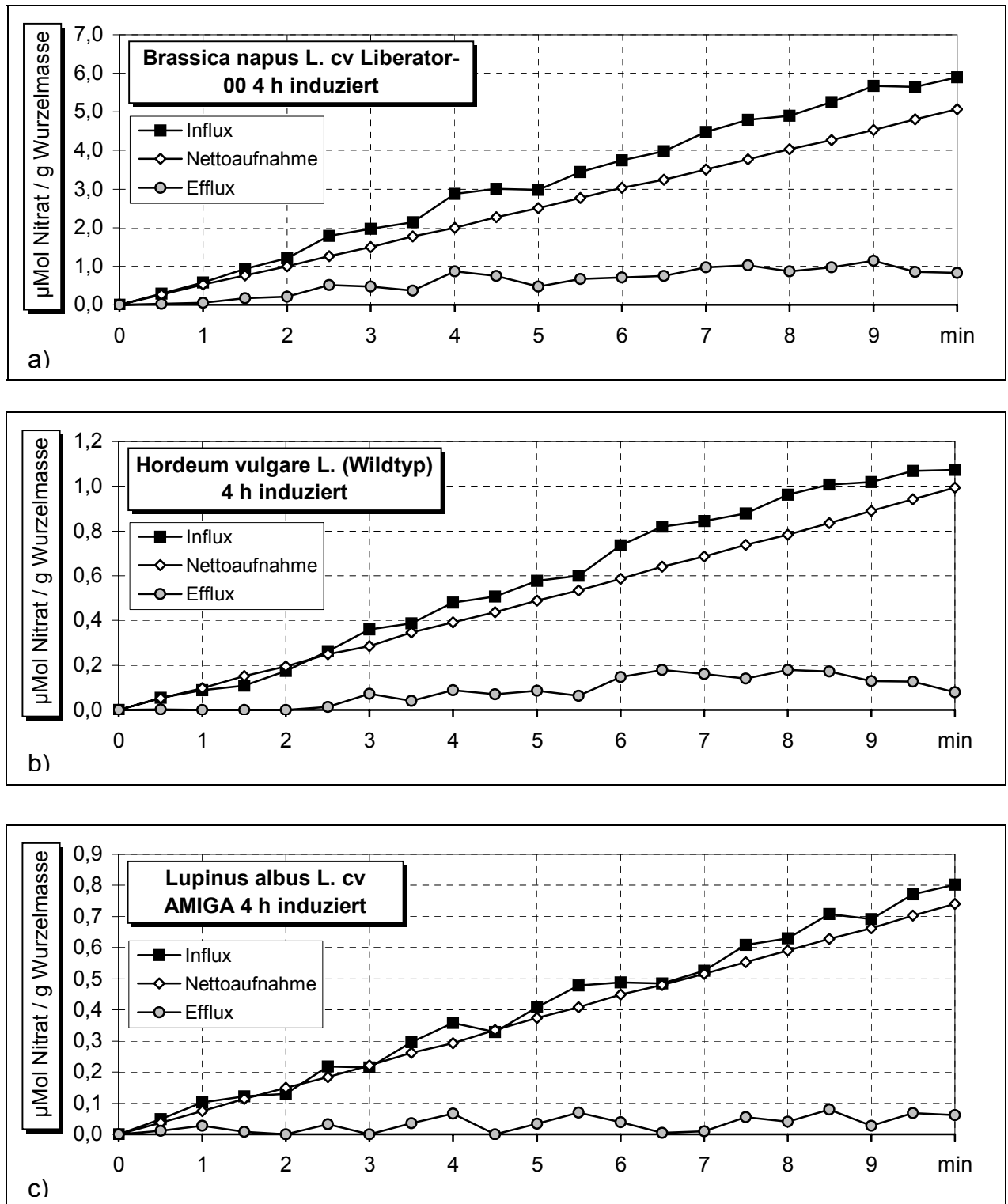


Abbildung 24a-c: Entwicklung der additiven Raten der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von NH_4^+ -ernährten **Rapspflanzen** (a), **Gerstenpflanzen** (b) und **Lupinen** (c) 4 h nach dem ersten Kontakt mit NO_3^- (Anzucht mit $150 \mu\text{M NH}_4^+$). Die Bestimmung der Aufnahmeraten erfolgte an 4 Rapspflanzen (Alter 20 d), 6 Gerstenpflanzen (Alter 20 d) und 3 Lupinen (Alter 26 d). Die Pflanzen wurden auf derselben Nährlösung angezogen und kamen am Versuchstag zum ersten Mal in Kontakt mit NO_3^- (vgl. Abbildung 23a-c).

4.3.7 Auswirkungen von Kalium auf die Nitrataufnahme

Der Einfluss von K^+ auf die Nitrataufnahme von *Brassica napus* L. ist in Tabelle 21 dargestellt. Während K^+ -ernährte Pflanzen bei einem Nitratangebot von 250 μM einen Nitratinflux von ca. 20,5 $\mu Mol/g FM h^{-1}$ zeigten (Abbildung 14, S.63), lag der Influx bei den K-Mangelpflanzen nur bei 17,5 $\mu Mol/g FM h^{-1}$. Wurden die Pflanzen auf ein Medium mit K^+ umgesetzt, so stieg die Nitrataufnahme bereits nach 4 Stunden auf 21,4 $\mu Mol/g h^{-1}$ deutlich an. Dies beruhte vor allem auf einem verstärkten Nitratinflux, der allerdings mit einem stärkeren Efflux gekoppelt war. Während der Markierungsdauer wurde auch der Transport von Nitrat in den Rapspflanzen beschleunigt, denn nach der Markierung befanden sich nur noch 45% des aufgenommenen $^{13}NO_3^-$ in den Wurzeln der K-induzierten Pflanzen, während die Kontrolle (-K) noch 51% des aufgenommenen $^{13}NO_3^-$ in den Wurzeln zeigte.

Im Gegensatz zu den Induktionsprozessen nach vorausgehender Ammoniumernährung war bei der Induktion mit K^+ die maximale Aufnahmezeit nicht nach ca. 4 h erreicht, sondern erst nach ca. 2 Tagen (Tabelle 21).

Da der höchste Wert für den Nitratinflux der K-induzierten Rapspflanzen um fast 5 $\mu Mol / g FM h^{-1}$ über dem Influx von kontinuierlich K-ernährter Pflanzen liegt, ist anzunehmen, dass die Aufnahmezeit in den folgenden Tagen wieder auf das Niveau der im *steady state* angezogenen Pflanzen zurückgeht.

Tabelle 21: Aufnahme und Verlagerung von $^{13}NO_3^-$ bei 15 min Markierung von 25 d alten Rapspflanzen (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden 10 d vor Versuchsbeginn auf ein Nährmedium ohne K^+ gesetzt. Während des Versuchs wurden die Pflanzen wieder auf Medium mit K^+ (700 μM) gesetzt.

Relative Verteilung* des während der Markierung aufgenommenen $^{13}NO_3^-$	Kontrolle (- K)	4 h induziert (+ K)	1 d induziert (+ K)	2 d induziert (+ K)
Blatt	45%	51%	49%	50%
Spross	4%	4%	6%	6%
Wurzel	51%	45%	45%	44%
	n=9	n=12	n=6	n=6
Nitratflux in $\mu Mol / g FM h^{-1}$				
Influx	17,5	21,4	24,2	25,8
Nettoaufnahme	16,4	19,8	22,6	24,2
Efflux	1,1	1,6	1,6	1,6

* Gesamtpflanze = 100%

4.3.8 Einfluss der Ernährungsbedingungen auf den Nitratgehalt und ausgewählte Kationen in unterschiedlichen Pflanzenorganen von *Brassica napus* L.

Bisher wurde vor allem die Aufnahme und die Verlagerung von K^+ und NO_3^- in der Pflanze betrachtet. Welche Mengen der beiden Nährelemente in den verschiedenen Teilen der Pflanze gespeichert sind, konnte dabei nicht beantwortet werden.

Um diese Fragestellung aufzugreifen, wurden alle Versuchspflanzen mit 250 $\mu\text{Mol } NO_3^-$ angezogen, während bei der K^+ -Ernährung Abstufungen von 0, 30 und 700 μM gemacht wurden. Die Anzuchtbedingungen waren so gewählt, dass alle Pflanzen 2 d vor der Ernte das 4-Blatt-Stadium erreicht hatten.

Neben den Varianten mit gleich bleibender K^+ -Ernährung wurden von der 0 $\mu\text{M } K^+$ -Variante einige Pflanzen kurzzeitig auf ein Medium mit 700 $\mu\text{M } K^+$ umgesetzt. Von der anfänglich mit 700 $\mu\text{M } K^+$ -ernährten Variante wurden einige Pflanzen temporär auf K^+ -Mangelmedium gesetzt. Das Umsetzen auf das neue Medium erfolgte zwischen 0,5 h und 2 d vor der Ernte.

Die unterschiedliche Vorbehandlung wirkte sich nicht nur auf die Aufnahme und die Größe des Nitrat- oder Kalium-Pools der Pflanzen, sondern auch auf die Konzentrationen anderer Ionen aus. In Tabelle 22 (S.82) ist zu erkennen, dass bereits bei einem K^+ -Angebot von 30 μM die Größe des Nitrat- und Kalium-Pools von *Brassica napus* L. deutlich über denjenigen von K^+ -Mangelpflanzen liegt.

Die Unterschiede zwischen den kontinuierlich mit 0 $\mu\text{M } K^+$ bzw. 30 $\mu\text{M } K^+$ ernährten Varianten belegen, dass die 0 $\mu\text{M } K^+$ -Variante einem deutlichen Nährstoffmangel unterlag.

Wird das Nährmedium gewechselt und ein **K^+ -Mangel induziert**, so findet bei den zweiwertigen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} ein geringer Anstieg im Pflanzengewebe statt (Tabelle 22, S.82). Der einsetzende K^+ -Mangel hat auf die NO_3^- -Konzentration in Wurzel und Spross, selbst nach 2 d, keinen nennenswerten Einfluss gezeigt. Lediglich in den Blättern ist der NO_3^- -Gehalt um etwa 20% (von 1625 auf 1319 $\mu\text{M } NO_3^-$) zurückgegangen. Deutliche Veränderungen ergeben sich jedoch bei K^+ , dessen Pool nach der Umstellung langsam kleiner wird. Die Abnahme des K^+ -Pools der Wurzeln erfolgt schneller als im Spross oder den Blättern. So ist nach 2 d unter K^+ -Mangel in den

E r g e b n i s s e

Wurzeln ein Rückgang des K^+ -Pools um 32% (von 1342 auf 917 μM K^+) zu verzeichnen, während die K^+ -Konzentration im Spross nur um 23% (von 1503 auf 1182 μM) und in den Blättern um 21% (von 659 auf 508 μM) zurückgegangen ist. Die Konzentration von Na^+ steigt dabei etwas langsamer, als die K^+ -Konzentration abnimmt.

Tabelle 22: Einfluss der Kaliumernährung von *Brassica napus* L. auf die Gehalte von NO_3^- , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und in verschiedenen Pflanzenorganen. Alle Pflanzen waren zur Ernte im 4-Blatt Stadium und wurden zum selben Zeitpunkt geerntet. Wegen der unterschiedlichen Anzuchtbedingungen waren K-Mangelpflanzen 25 d, die auf Vollmedium angezogenen Pflanzen 22 d alt.

steady state K 700 μM	Dauer auf K-Mangelmedium					steady state K 30 μM	steady state K 0 μM	Dauer (700 μM K+) mit normaler K-Versorgung				
	0.5 h	3 h	6 h	1 d	2 d			0.5 h	3 h	6 h	1 d	2 d

NO_3^- in μM / g TM

Blatt	1625	1419	1547	1524	1286	1319	951	351	354	290	409	666	966
Spross	2352	2358	2362	2412	2335	2443	1969	1549	1356	1579	1590	1758	2146
Wurzel	1280	1334	1411	1201	1055	1269	986	776	888	1018	1060	1135	1124

K^+ in μM / g TM

Blatt	659	583	756	585	577	508	289	98	95	182	271	544	656
Spross	1503	1477	1470	1350	1137	1182	679	107	79	125	326	431	639
Wurzel	1342	1311	1291	1240	1052	917	460	322	321	412	444	709	767

Na^+ in μM / g TM

Blatt	309	324	345	365	331	392	763	1017	1101	916	1011	979	644
Spross	317	306	328	305	246	293	1049	1660	1648	1616	1774	1419	1337
Wurzel	281	267	310	248	260	277	843	1004	1136	1077	1190	871	839

Mg^{2+} in μM / g TM

Blatt	248	235	245	256	264	286	358	380	371	287	359	312	308
Spross	193	168	182	184	232	252	216	239	226	238	244	240	235
Wurzel	109	121	119	140	186	210	174	145	136	114	119	93	102

Ca^{2+} in μM / g TM

Blatt	792	773	866	845	820	888	913	808	753	835	749	729	746
Spross	413	372	430	431	477	494	546	456	394	418	423	459	410
Wurzel	156	135	134	127	125	124	176	166	149	151	141	164	160

Beim Umstellen von K^+ -Mangel auf ein Medium mit K^+ ist bei den zweiwertigen Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) nur eine geringfügige Abnahme festzustellen.

Bei K^+ ist eine schnelle und starke Zunahme der K^+ -Konzentration in allen Geweben zu beobachten, die von einem gleichzeitigen Rückgang der Na^+ -Konzentration begleitet wird. Nach 2 d auf Medium mit 700 μM K^+ hat der K^+ -Pool in Blättern von 15% auf 100%, der K^+ -Konzentration von kontinuierlich mit 700 μM K^+ ernährten Pflanzen, zugenommen (Tabelle 23). Im Spross und in der Wurzel werden nach 2 d erst 43% bzw. 57% des Gehaltes der +K-Pflanzen erreicht.

Parallel zu K^+ wird, bei Aufheben des K^+ -Mangels, auch NO_3^- verstärkt eingelagert. Da die Pflanzen eine ausreichende N-Ernährung erfahren hatten, ist die relative Zunahme des N-Pools geringer als bei K^+ . In Spross und Wurzel ist nach 2 d ein Anstieg von ca. 65% auf ca. 90% des NO_3^- -Gehaltes der +K-Variante zu beobachten (Tabelle 23). In den Blättern der -K-Variante lag der NO_3^- -Gehalt mit nur 22% der +K-Variante deutlich niedriger als in Spross oder Wurzel. Nach 2 d in guter K^+ -Versorgung ist der NO_3^- -Gehalt auf 59% angestiegen. Damit fällt der Anstieg deutlich schwächer aus als derjenige von K^+ in den Blättern.

Neben der Veränderung der Anionen- und Kationen-Gehalte bei Umstellung des Nährmediums (Tabelle 22) fällt auf, dass in allen Varianten die Summe der einwertigen Kationen in den Blättern mit 900-1200 $\mu M/g$ TM deutlich niedriger liegt als im Spross (1600-1800 $\mu M/g$ TM) oder in der Wurzel (1300-1600 $\mu M/g$ TM).

Tabelle 23: Relative Gehalte von Nitrat und Kalium in verschiedenen Fraktionen von *Brassica napus* L. Als Referenz dienten die Gehalte der kontinuierlich mit 700 μM K^+ und 250 μM NO_3^- ernährten Variante, welche auf 100% gesetzt wurde. Weitere Details siehe Tabelle 22.

Vorbehandlung	NO_3^- Konzentration			K^+ Konzentration		
	0 μM K^+ steady state	-K, 2 d auf 700 μM K^+	+K 2 d auf 0 μM K^+	0 μM K^+ steady state	-K, 2 d auf 700 μM K^+	+K. 2 d auf 0 μM K^+
Blatt	22%	59%	81%	15%	100%	77%
Spross	66%	91%	104%	7%	43%	79%
Wurzel	61%	88%	99%	24%	57%	88%

4.4 Kaliumaufnahme

Mit den folgenden Versuchen sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss der K^+ -Status von *Brassica napus* L. auf die Kaliumaufnahme hat. Zu diesem Zweck wurden Rapspflanzen 14 d unter K^+ -Mangel, mit $30 \mu M K^+$, $100 \mu M K^+$ bzw. $700 \mu M K^+$ (Kontrolle) angezogen, wobei das NO_3^- -Angebot bei allen Varianten $150 \mu M$ betrug. Als weitere Kontrolle wurde noch eine NH_4^+ -Variante ($150 \mu M NH_4^+$) eingeführt, die mit $700 \mu M K^+$ kultiviert wurde.

Da die K^+ -Aufnahme unter vergleichbaren Bedingungen untersucht werden sollte, wurden alle Pflanzen in der Mitte der Photoperiode auf eine Aufnahmelösung umgesetzt, die $150 \mu M NO_3^-$ und $700 \mu M K^+$ enthielt. Eine Ausnahme bildete die NH_4^+ -Variante, bei der um Überlagerungen mit der Induktion der Nitrataufnahme auszuschließen, die Aufnahmelösung eine äquivalente Menge NH_4^+ enthielt.

Wie Tabelle 24 zu entnehmen ist, lag die durchschnittliche K^+ -Aufnahme der Kontrolle ($700 \mu M K^+$ und $150 \mu M NO_3^-$) bei ca. $0,84 \mu M K^+/g FM h^{-1}$. Obwohl die Aufnahmeraten der 3 Mangelvarianten von dem für die Kontrolle ermittelten Wert um bis zu 9 % abweichen, ließ sich mit Hilfe des t-Tests kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Die K^+ -Aufnahme der NH_4^+ -Variante hingegen liegt ca. 17 % ($17,6$ gegenüber $18,4 \mu M/g FM h^{-1}$) unter der Aufnahme der Kontrolle und für sie ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied auf dem 5 %-Niveau des t-Tests.

Tabelle 24: Kaliumaufnahme von *Brassica napus* L. nach 14 d auf unterschiedlichem K^+ -Angebot. Alle Versuchspflanzen wurden in der Mitte der Photoperiode aus ihrem Anzuchtmedium entnommen und für 1 h auf eine Aufnahmelösung umgesetzt, die $700 \mu M K^+$ und $150 \mu M NO_3^-$ bzw. $150 \mu M NH_4^+$ enthielt. Wegen der unterschiedlichen Wachstumsraten hatten die Pflanzen bei der Ernte ein unterschiedliches Alter, sie befanden sich aber alle im 2.Laubblattstadium.

Mittlere Netto-Aufnahme in $\mu M / g FM h^{-1}$						
K^+ - Angebot	NO_3^- / NH_4^+ - Angebot	K^+	N	Standard- Abweichung der N-Aufnahme	Alter in d	n
0 μM	$150 \mu M NO_3^-$	0,76	16,4	$\pm 11,8\%$	25	12
30 μM	$150 \mu M NO_3^-$	0,82	17,5	$\pm 15,5\%$	23	9
100 μM	$150 \mu M NO_3^-$	0,88	18,2	$\pm 14,8\%$	21	9
700 μM	$150 \mu M NO_3^-$	0,84	18,4	$\pm 11,1\%$	20	12
700 μM	$150 \mu M NH_4^+$	0,69	17,6	$\pm 16,6\%$	26	5

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass bei *Brassica napus* L. ein 14-tägiger K^+ -Mangel oder eine Ernährung mit $30 \mu M K^+$ nicht dazu führen, dass die K^+ -Aufnahme bei diesen Pflanzen langsamer erfolgt als bei vollwertig K^+ -ernährten Rapspflanzen. Ob ein längerfristiger K^+ -Mangel zu einer Reduktion der Kaliumaufnahme führen kann, muss an dieser Stelle offen bleiben.

4.4.1 Kaliumaufnahme und OH^- -Abgabe von Rapspflanzen

Mit der zuletzt beschriebenen Versuchseinstellung wurde nur dem Einfluss des K^+ -Angebots auf die Kaliumaufnahme nachgegangen. Wenn K^+ , wie im **Ben Zioni**-Modell (1971) vorgeschlagen, eine wesentliche Rolle bei NO_3^- -Aufnahme und NO_3^- -Transport zukommen soll, dann stellt sich die Frage, ob K^+ auch einen Einfluss auf die OH^- -Abgabe Nitrat-ernährter Rapspflanzen hat.

Für den folgenden Versuch wurden Rapspflanzen 14 d vor Versuchsbeginn von normaler Nährlösung auf K^+ -Mangel umgestellt. Zwischen 3 h bis 2 d vor der Messung wurden mehrere Pflanzen wieder auf die Nährlösung mit $700 \mu M K^+$ zurückgesetzt. In der Mitte der Photoperiode erfolgte am Versuchstag der 1 h Aufnahmeversuch, wobei die Aufnahmelösung $150 \mu M NO_3^-$ und $700 \mu M K^+$ enthielt. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die kontinuierlich mit $700 \mu M K^+$ ernährt wurden ($+K_{steady state}$), und Pflanzen, welche weiterhin auf K^+ -Mangel gehalten wurden ($-K_{steady state}$).

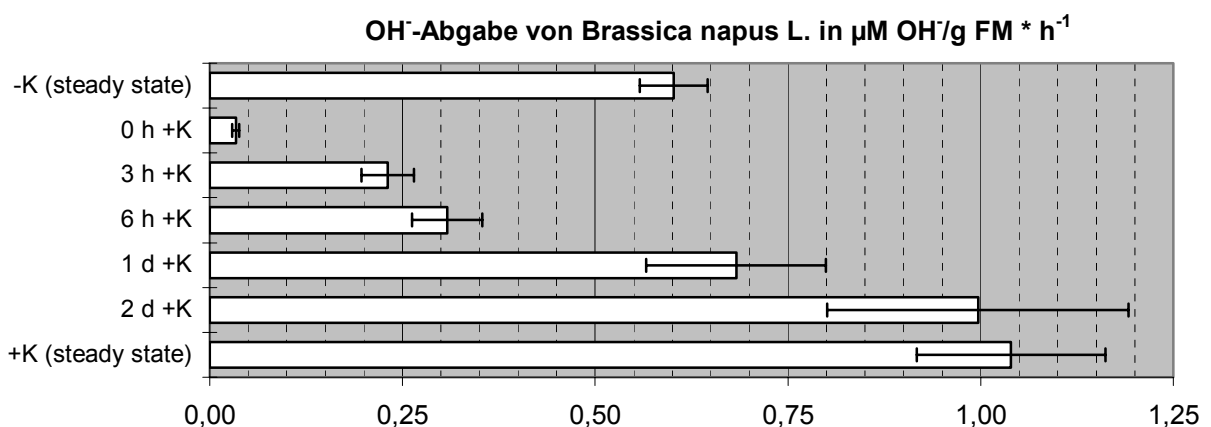


Abbildung 25: Einfluss der Kaliumaufnahme auf die OH^- -Abgabe von *Brassica napus* L. Die Pflanzen wurden kontinuierlich mit $150 \mu M NO_3^-$ angezogen und 14 d vor Versuchsbeginn von ausreichender K-Ernährung ($700 \mu M K^+$) auf K-Mangel ($0 \mu M K^+$) umgestellt.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von je 4 Pflanzensets (ein Set bestand aus 3 Pflanzen) an. Am Versuchstag waren die Pflanzen 21 - 23 d alt und befanden sich im 2.Laubblattstadium.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die Abgabe von OH^- in das Wurzelmedium unter K^+ -Mangel ($-\text{K}_{\text{steady state}}$) mit $0,60 \mu\text{M} / \text{g FM h}^{-1}$ deutlich hinter der OH^- -Abgabe von K^+ -ernährten Rapspflanzen ($+\text{K}_{\text{steady state}}$) mit $1,04 \mu\text{M} / \text{g FM h}^{-1}$ zurückbleibt.

Eine drastische Änderung in der OH^- -Abgabe der Wurzeln ist dann zu beobachten, wenn K-Mangelpflanzen auf ein Medium mit $700 \mu\text{M K}^+$ umgesetzt wurden. Während der ersten Stunde auf dem neuen Medium ist die OH^- -Abgabe kaum noch nachweisbar, steigt aber in den kommenden 6 h wieder bis auf ca. 55 % des Wertes der K-Mangelpflanzen an. Nach 1 d auf der K^+ -haltigen Nährlösung übersteigt die OH^- -Abgabe bereits den Wert der Mangelvariante um ca. 15 %, liegt aber noch 35 % unter der Abgabe der kontinuierlich mit K^+ ernährten Rapspflanzen. Erst ca. 2 d nach der Umstellung auf K^+ haben die ehemaligen Mangelpflanzen dieselbe OH^- -Abgabe erreicht, wie der auf dem Vollmedium angezogene Raps.

4.4.2 Verlagerung von K^+ in Rapspflanzen

Der bislang beschriebenen Versuchsansätze lieferten zwar Daten über die K^+ -Nettoaufnahme von *Brassica napus L.* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen, jedoch waren aus diesem Versuch keine Informationen über den Verbleib oder die Verlagerung des aufgenommenen K^+ zu erhalten. Mit Hilfe des Tracers ^{86}Rb war es möglich, im Rahmen eines *pulse chase*-Experiments diese Informationen über die Verteilung von K^+ in der Pflanze zu gewinnen. Dazu wurden Rapspflanzen unter

- A** NH_4^+ - Ernährung mit $700 \mu\text{M K}^+$
- B** NO_3^- - Ernährung mit $700 \mu\text{M K}^+$
- C** NO_3^- - Ernährung bei Kaliummangel ($0 \mu\text{M K}^+$)

angezogen, bis sie das 2.Laubblattstadium erreicht hatten. In der Mitte der Photoperiode erfolgte dann 30 min eine ^{86}Rb -Markierung in einer Nährlösung mit $700 \mu\text{M K}^+$. Nach dem Abspülen der Nährlösung von den Wurzeln wurden die Rapspflanzen für 10 bis 90 min auf eine inaktive Nährlösung gesetzt, die in ihrer Zusammensetzung der Markierungslösung entsprach. Im Anschluss an diese Verteilungsphase wurden die Pflanzen geerntet und über das $^{86}\text{Rb}^+$ der Transport in die verschiedenen Fraktionen sowie die Abgabe in die Nährlösung festgehalten (Abbildung 26 A-C).

Stacked bar chart showing the percentage distribution of plant parts (Blatt, Sprossachse, Wurzel, Efflux) over time (10, 20, 40, 60, 90 min). The y-axis ranges from 0% to 100%.

Time (min)	Efflux (%)	Wurzel (%)	Sprossachse (%)	Blatt (%)
10	~2	~88	~5	~5
20	~2	~82	~5	~11
40	~2	~76	~5	~17
60	~2	~70	~5	~23
90	~2	~62	~5	~31

87

Bei allen 3 Varianten lag die errechnete Kaliumaufnahme über den Werten, die für nicht markierte Nährlösungen ermittelt wurden (Tabelle 22, S.82). Der K^+ -Efflux aus den Wurzeln der beiden +K-Varianten (Abbildung 26 B & C, S.92) konnte beim konventionellen Aufnahmeversuch nicht gemessen werden, jedoch war es mit Hilfe des $^{86}Rb^+$ möglich, den Austritt von K^+ aus den Wurzeln zu erfassen.

Die K^+ -Verlagerung in den beiden NO_3^- -Varianten (Abbildung 26 B & C) unterscheidet sich, abgesehen von der geringeren K^+ -Aufnahmerate der Mangelvariante (C), nur im K^+ -Efflux. Die Rapspflanzen der beiden Varianten hatten bis zum Ende des 90 min *pulse chase* - Experiments ca. 28 % des zuvor aufgenommenen K^+ in die Blätter und ca. 7 % in die restliche Sprossachse verlagert. Während die +K-Variante (B) bereits 7 % des während der Markierung aufgenommenen K^+ abgegeben und somit nur 58 % in der Wurzel zurückgehalten hatte, wurden von der -K - Variante (C) im gleichen Zeitraum nur knapp 1 % des K^+ wieder über die Wurzeln abgegeben. Der vernachlässigbare K^+ -Efflux der -K - Variante (B) lässt sich dadurch erklären, dass diese Rapspflanzen noch als K^+ - *sink* zu betrachten sind. Der cytoplasmatische K^+ -Gehalt in ihren Wurzeln ist demnach noch so gering, dass eine K^+ -Abgabe über Ionenkanäle nicht aufgrund eines Konzentrationsgradienten gegenüber dem Nährmedium erfolgen kann.

Die NH_4^+ -Variante (Abbildung 26 A) zeigte ein davon abweichendes Verteilungsmuster. Mit ca. 19 % des während der Markierung aufgenommenen K^+ erhielten die Blätter dieser Rapspflanzen deutlich weniger K^+ als bei den NO_3^- -Varianten. In den restlichen Teilen des Sprosses wurden 10 % des aufgenommenen K^+ nachgewiesen, was über dem Wert der NO_3^- -Varianten liegt. Ob bei der NH_4^+ -Variante die K^+ -Verlagerung langsamer erfolgt, oder ob die Sprossachse hier einen höheren K^+ -Bedarf als bei den NO_3^- -Varianten besitzt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Im Hinblick auf den Efflux bleibt jedoch festzustellen, dass mit ca. 8 % fast derselbe Anteil des aufgenommenen K^+ wieder über die Wurzeln abgegeben wurde (Abbildung 26 A), wie bei der im Vollmedium angezogenen NO_3^- -Variante (Abbildung 26 B).

4.5 Untersuchungen des Xylemsaftes

4.5.1 Einfluss von N- und K-Angebot auf den Xylemsaft von *Brassica napus* L.

Untersuchungen des Xylemsaftes erlauben es, ein Bild der Stoffströme von der Wurzel in den Spross aufzuzeigen. Wenn sich beispielsweise bei der Veränderung der Zusammensetzung der Nährlösung auch eine andere Transportgeschwindigkeit im Xylem ergibt, so ist neben der Messung der Konzentration auch das Volumen des gesammelten Exudats von Bedeutung.

Bei *Brassica napus* L. ist Nitrat das Anion, das in größten Mengen im Xylem transportiert wird (Tabelle 25). Im *steady state* unterscheiden sich Varianten mit 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ und 2500 $\mu\text{M NO}_3^-$ vor allem darin, dass mit dem höheren N-Angebot auch ein stärkerer Xylemstrom verbunden ist.

Tabelle 25: Einfluss der K⁺-Ernährung auf die Zusammensetzung des Xylemexudats von *Brassica napus* L.. Neben den Konzentrationen der wichtigsten Anionen bei gleich bleibender Ernährung (*steady state*) wurden auch die Veränderungen der Zusammensetzung des Xylemsaftes bei Umstellung der K-Ernährung untersucht. Die Pflanzen waren zur Ernte 21–24 d alt (2.Laubblattstadium). Für jeden Messwert wurde der Xylemsaft von 6–9 Rapspflanzen gesammelt und vereinigt. Für die Variante mit 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ liegen 4, für die andere Variante 2 Wiederholungen vor.

Brassica napus L.	$\mu\text{M} / \text{ml}$			Exudat $\mu\text{l} / \text{g FM h}^{-1}$	Anionenfluß in $\mu\text{M/g FG h}^{-1}$			
	P	N	S		P	N	S	gesamt

250 μM Nitrat

K (steady state)	1,99	19,95	3,11	112	0,22	2,23	0,35	2,80
3 h K-Mangel	2,07	22,54	4,23	64	0,13	1,44	0,27	1,84
6 h K-Mangel	1,88	23,82	4,13	82	0,15	1,95	0,34	2,44
1 d K-Mangel	2,01	22,73	3,89	88	0,18	2,00	0,34	2,52
K-Mangel (steady state)	1,15	16,25	2,54	98	0,11	1,59	0,25	1,95
3 h K-Angebot	1,03	18,12	2,33	120	0,12	2,17	0,28	2,57
6 h K-Angebot	0,92	20,04	2,61	117	0,11	2,34	0,31	2,76
1 d K-Angebot	1,05	21,08	2,27	115	0,12	2,42	0,26	2,80

2500 μM Nitrat

K (steady state)	1,92	20,83	2,98	135	0,26	2,81	0,40	3,47
3 h K-Mangel	2,14	22,71	2,96	88	0,19	2,00	0,26	2,45
6 h K-Mangel	2,06	21,39	2,31	100	0,21	2,14	0,23	2,58
1 d K-Mangel	2,23	19,81	3,06	105	0,23	2,08	0,32	2,63
K-Mangel (steady state)	1,76	22,43	1,29	129	0,23	2,89	0,17	3,29
3 h K-Angebot	1,34	16,56	1,17	157	0,21	2,60	0,18	2,99
6 h K-Angebot	1,22	15,97	0,67	144	0,18	2,30	0,10	2,58
1 d K-Angebot	1,86	18,60	1,69	136	0,25	2,53	0,23	3,01

Die im Vollmedium mit $250 \mu\text{M NO}_3^-$ angezogenen Pflanzen transportieren im Xylem mit $2,23 \mu\text{M NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ eine Anionenfracht, welche die von Sulfat um das 6,4-fache ($0,35 \mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$) und diejenige von Phosphat um das 10-fache ($0,22 \mu\text{M HPO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$) übersteigt. Bei einem Xylemstrom von $112 \mu\text{l/g FM h}^{-1}$ liegen diesen Werten Anionenkonzentrationen von $19,95 \mu\text{M NO}_3^-/\text{ml}$, $3,11 \mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{ml}$ und $1,99 \mu\text{M HPO}_4^{2-}/\text{ml}$ zugrunde.

Bei hohem Nitratangebot ($2500 \mu\text{M}$) liegt der Xylemstrom mit $135 \mu\text{l/h}$ um ca. 20% über der $250\mu\text{M}$ -Variante (Tabelle 25, S.89). Während die Nitratkonzentration im gesammelten Exudat mit $20,83 \mu\text{M/ml}$ höher lag als bei der $250 \mu\text{M}$ -Variante (+4%), ist die Konzentration von Sulfat auf $2,98 \mu\text{M/ml}$ (-4%) und die von Phosphat auf $1,92 \mu\text{M/ml}$ (-4%) leicht zurückgegangen. Wegen des deutlich höheren Xylemstroms ist die Transportrate aller Anionen jedoch gestiegen. Mit Transportraten von $2,81 \mu\text{M NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ (+26%), $0,4 \mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$ (+14%) und $0,26 \mu\text{M HPO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$ (+18%) bleibt das Verhältnis der Anionen zueinander nahezu unverändert.

Die K-Mangelvarianten unterscheiden sich von den Pflanzen im Vollmedium dadurch, dass hier neben einem geringeren Xylemstrom auch niedrigere Anionenkonzentrationen auftreten (Tabelle 25, S.89). Ein schwächerer Xylemstrom und eine geringere Anionenkonzentrationen führen dazu, dass der Anionenfluss in $\mu\text{M/g FM h}^{-1}$ bei den K-Mangelvarianten deutlich niedriger liegt als bei den Vergleichspflanzen auf dem Vollmedium.

Bei Ernährung mit $250 \mu\text{M NO}_3^-$ wirkt sich der K-Mangel schon in dem um 12,5% geringeren Xylemstrom ($98 \mu\text{l/g FM h}^{-1}$) aus. Mit $1,59 \mu\text{M NO}_3^-/\text{g FM h}^{-1}$ (-29%), $0,25 \mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$ (-29%) und $0,11 \mu\text{M HPO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$ (-50%) dominiert hier Nitrat noch stärker als bei den vergleichbaren Pflanzen auf Vollmedium. Die Nitratfracht im Xylem übersteigt damit die Sulfatfracht um das 7,4-fache, die Phosphatfracht sogar um das 14,5-fache.

Werden die Pflanzen mit $2500 \mu\text{M NO}_3^-$ angezogen (Tabelle 25, S.89), so liegt die Menge des gesammelten Exudats ($129 \mu\text{l/g FM h}^{-1}$) um 5% unter denen der K-ernährten Pflanzen. Große Unterschiede ergeben sich jedoch bei der Betrachtung der einzelnen Anionen. Während der Phosphatstrom hier nur um 12% reduziert ist ($0,23 \mu\text{M HPO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$), beträgt die Sulfatfracht des Xylems nur noch 57% ($0,17 \mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$). Dagegen liegt die Nitratfracht mit $2,89 \mu\text{M SO}_4^{2-}/\text{g FM h}^{-1}$ sogar 3%

über der Transportrate der K-ernährten Pflanzen. Da Nitrat bei einem hohen Angebot durch das passive LATS aufgenommen wird, kann eine vergleichbar hohe Nitratfracht zustande kommen. Die verringerten Sulfat- und Phosphatfrachten lassen sich dadurch erklären, dass der Anteil anderer Anionen zu Gunsten von Nitrat reduziert werden muss, um die elektrische Ladung des Xylems beizubehalten.

Mit dem Umstellen der Nährlösung auf K-Mangel ist in den ersten 3 h, unabhängig vom N-Angebot, eine Reduktion der Menge des gesammelten Exudats um 25% - 35% zu beobachten (Tabelle 25). Dies ist jedoch mit einem Anstieg der Ionenkonzentration im Xylem gekoppelt, so dass der Ionentransport zwar reduziert, eine Versorgung der restlichen Pflanzenteile aber dennoch sichergestellt ist. In den kommenden 6 h bis 1 d nach der Umstellung steigt die Strömungsgeschwindigkeit des Xylems wieder an, wobei gleichzeitig die Konzentrationen der Anionen wieder sinken. Insgesamt ist zwar wieder ein Ansteigen des Ionentransports zu beobachten, jedoch scheint sich die Transportrate mittelfristig auf einem niedrigeren Niveau zu stabilisieren. Bei länger anhaltendem K-Mangel ist allerdings wieder ein Rückgang auf das Niveau der K-Mangelvariante zu erwarten.

Werden die Rapspflanzen nach K-Mangel auf ein Medium mit K^+ umgesetzt, so ist dies mit einem um 16-22% beschleunigten Xylemtransport verbunden. Während der Transport von Phosphat und Sulfat nur geringe absolute Schwankungen aufweist, ist die Änderung des Nitrattransports anscheinend auch vom Nitratangebot abhängig. So steigt bei der 250 μM N-Variante der Nitratstrom beständig von 1,59 auf 2,42 $\mu M NO_3^-/g FM h^{-1}$ (Tabelle 25). Auch die Menge der insgesamt transportierten Anionen nimmt zu und nach 1 d hat der Anionenstrom in dieser Variante bereits das Niveau der kontinuierlich K^+ -ernährten Pflanzen erreicht.

Dagegen sinkt bei der 2500 μM N-Variante der Nitratstrom unter den Wert im *steady state* (-K) ab und erreicht selbst nach 1 d noch nicht das Ausgangsniveau. Möglicherweise war bei hohem N-Angebot bereits unter K-Mangel die Nitratversorgung des Sprosses ausreichend gedeckt und eine schnelle Steigerung der Transportrate nicht notwendig.

Werden die Kationen in die Bilanzierung der Ionenfrachten des Xylems mit einbezogen (Tabelle 26), so zeigt sich, dass bei *Brassica napus* L. der Anteil der im Xylem transportierten Anionen bei allen Kulturbedingungen weit überwiegt. Im *steady state* sind die Transportraten von Mg^{2+} und Ca^{2+} unter K-Mangel geringfügig höher als bei normaler Ernährung. Deutliche Unterschiede bestehen bei den Transportraten von K^+ und Na^+ .

Unter K-Mangel ist der K-Strom im Xylem sehr gering, steigt aber bei Angebot von K^+ stark an, während der Na^+ -Strom in gleichem Maß zurückgeht. Da die Transportrate von Na^+ schneller sinkt, als der K^+ -Transport zunimmt, gleichzeitig aber der NO_3^- Transport im Xylem stark ansteigt, wird das Verhältnis von Anionen zu Kationen stark in Richtung der Anionen verschoben.

Wird *Brassica napus* L. Raps hingegen das K^+ -Angebot entzogen, so sinkt der K^+ -Transport im Xylem nur langsam (Rückgang von 0,361 auf 0,306 $\mu M/g FM h^{-1}$), begleitet von einem Anstieg des Na^+ -Transportes (Zunahme von 0,018 auf 0,033 $\mu M/g FM h^{-1}$). Der gleichzeitige Rückgang der NO_3^- -Fracht bewirkt, dass sich die Transportraten im Xylem nun in Richtung der Kationen verschieben.

Obwohl eine Veränderung des K^+ -Angebotes bei *Brassica napus* L. starke Änderungen

Tabelle 26: Einfluss der Kaliumernährung auf ausgewählte Anionen und Kationen im Xylemsaft von *Brassica napus* L. bei Anzucht mit 250 $\mu M NO_3^-$. Der Xylemsaft von je 6 - 9 Rapspflanzen (2.Laubblattstadium) unter gleichen Anzuchtbedingungen wurde vereinigt und mittels HPLC-Analytik bestimmt. Für jede Variante wurden 6 Wiederholungen durchgeführt.

Brassica napus L. (250 $\mu M NO_3^-$) Ionenstrom im Xylem in $\mu M / g FM h^{-1}$									
	HPO_4^{2-} $H_2PO_4^-$	NO_3^-	SO_4^{2-}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Na^+	K^+	Anionen -Kationen	
700 $\mu M K$ (steady state)	0,219	2,189	0,284	0,079	0,046	0,018	0,361	2,188	
3 h K-Mangel	0,207	1,752	0,324	0,090	0,049	0,033	0,306	1,805	
K-Mangel (steady state)	0,122	1,634	0,249	0,101	0,067	0,471	0,023	1,343	
3 h K-Ernährung	0,132	2,115	0,271	0,105	0,073	0,148	0,263	1,929	

beim Anteil der einwertigen Kationen im Xylem nach sich zieht, sind diese Änderungen doch gering im Vergleich zur Modifikation des NO_3^- -Transports. So bestimmt dann auch vor allem der NO_3^- -Transport, ob sich das Verhältnis von Anionen zu Kationen im Xylem in die eine oder andere Richtung verschiebt.

4.5.2 Einfluss von N- und K-Angebot auf den Xylemsaft von *Lupinus albus* L.

Mit *Lupinus albus* L. wurden ebenfalls Untersuchungen des Xylemsaftes durchgeführt. Da die Lupine Nitrat bereits in großem Maße in der Wurzel reduziert, war bei den Versuchen ein anderes Bild bei der Verteilung der Kationen zu erwarten. In den Chromatogrammen der Xylemsaftproben von *Lupinus albus* L. war neben den anorganischen Anionen auch ein breiter Peak zu erkennen, der vermutlich organische Säuren darstellte (Abbildung 27). Eine Identifikation der Säuren war jedoch mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich.

Die Lupine zeigte in allen untersuchten Varianten (Tabelle 27, S.94) mit 29 - 42 $\mu\text{l/g FM h}^{-1}$ einen deutlich geringeren Xylemstrom im Vergleich zu Raps (Tabelle 25, S.89 : 62 - 157 $\mu\text{l/g FM h}^{-1}$).

Bei Anzucht mit **250 $\mu\text{M NO}_3^-$** im *steady state* sind die Xylemsaftabgabe und der Anionenstrom im Xylem bei +K-Variante und der K-Mangelvariante annähernd gleich. Die Transportraten der untersuchten Anionen liegen bei *Lupinus albus* L. mit ca. 0,04 $\mu\text{M / g FM h}^{-1}$ fast auf dem gleichen Niveau. Eine geringere Nitratfracht der K-Mangelvariante wird durch einen erhöhten Phosphatstrom ausgeglichen. Bei Veränderung des K-Angebots in der Nährlösung reagiert die Lupine, genau wie der Raps, mit einem verringerten Xylemstrom auf einsetzenden K-Mangel bzw. mit verstärkter Bildung von Xylemexudat bei beginnender K-Ernährung. Die Anionenkonzentrationen verändern sich dabei allerdings so, dass die Ionenfracht des Xylems gleich bleibt.

Werden die Pflanzen mit **2500 $\mu\text{M NO}_3^-$** angezogen, so liegt der Xylemstrom nur unwesentlich über dem bei Anzucht mit 250 $\mu\text{M NO}_3^-$. Die Ionenfracht ist jedoch fast doppelt so hoch (Tabelle 27). Dies ist allein auf eine starke Zunahme des transportierten NO_3^- zurückzuführen. Werden die Pflanzen auf K-Mangel umgestellt, so geht dies mit einer Reduktion des Xylemsaftstromes und einer Verringerung des Nitrattransports einher. Die Fracht der anderen Anionen bleibt nahezu unverändert.

Wird den Pflanzen nach K- Mangel jedoch K^+ angeboten, so findet hier kein verstärkter Xylemtransport statt.

Aufgrund fallender Transportraten von Nitrat ist sogar ein Rückgang des gesamten Anionentransports zu beobachten. Da mit einem hohen Angebot an Nitrat die Synthese von Aminosäuren in den Wurzeln der Lupine jedoch stark ansteigen dürfte, ist anzunehmen, dass der Anteil der organischen Säuren im Xylem jetzt stark ansteigt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Größe des Peaks der organischen Säuren (Abbildung 27, S.95) nach Umstellung von K-Mangel auf K^+ -haltiges Medium deutlich zunahm.

Tabelle 27: Einfluss der K^+ Ernährung auf die Zusammensetzung des Xylemexudats von *Lupinus albus* L. Neben den Konzentrationen der wichtigsten Anionen bei gleich bleibender Ernährung (*steady state*) wurden auch die Veränderungen der Zusammensetzung des Xylemsaftes bei Umstellung der K-Ernährung untersucht. Die Pflanzen waren zur Ernte 26-29 d alt.

Für jeden Messwert wurde der Xylemsaft von 4 - 6 Lupinen gesammelt und vereinigt. Für alle Varianten liegen 2 Wiederholungen vor.

Lupinus albus L.	$\mu\text{M} / \text{ml}$			Exudat $\mu\text{l} / \text{g FM h}^{-1}$	Anionenfluß in $\mu\text{M/g FG h}^{-1}$			
	P	N	S		P	N	S	gesamt

250 μM Nitrat

K (steady state)	1,22	1,00	0,96	37	0,05	0,04	0,04	0,13
3 h K-Mangel	1,35	1,58	0,96	29	0,04	0,05	0,03	0,12
6 h K-Mangel	0,96	1,20	0,92	32	0,03	0,04	0,03	0,10
1 d K-Mangel	1,18	0,51	0,98	34	0,04	0,02	0,03	0,09
K-Mangel (steady state)	1,90	0,86	0,96	39	0,07	0,03	0,04	0,14
3 h K-Angebot	1,42	0,75	1,42	41	0,06	0,03	0,06	0,15
6 h K-Angebot	1,35	0,53	1,63	40	0,05	0,02	0,07	0,14
1 d K-Angebot	1,85	0,47	1,29	38	0,07	0,02	0,05	0,14

2500 μM Nitrat

K (steady state)	1,18	5,47	0,98	41	0,05	0,22	0,04	0,31
3 h K-Mangel	1,29	5,43	1,00	32	0,04	0,17	0,03	0,24
6 h K-Mangel	0,98	4,57	0,89	30	0,03	0,14	0,03	0,20
1 d K-Mangel	1,30	2,96	0,97	33	0,04	0,10	0,03	0,17
K-Mangel (steady state)	1,75	5,92	1,03	42	0,07	0,25	0,04	0,36
3 h K-Angebot	1,33	3,35	1,41	40	0,05	0,13	0,06	0,24
6 h K-Angebot	1,31	1,96	1,49	39	0,05	0,08	0,06	0,19
1 d K-Angebot	1,76	2,58	1,42	42	0,07	0,11	0,06	0,24

Ergebnisse

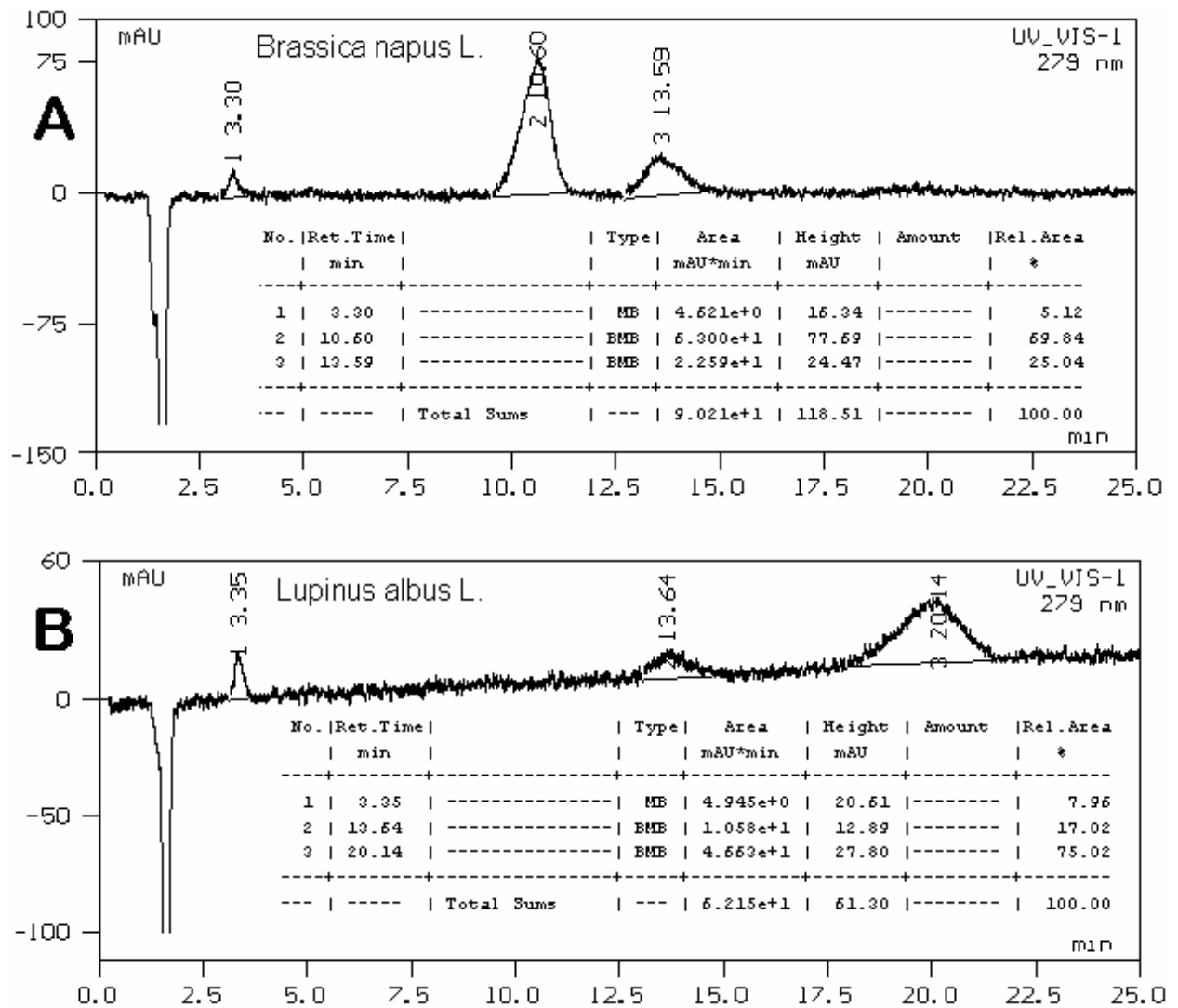


Abbildung 27: Chromatogramme des Xylemsaftes von *Brassica napus* L. (A) und *Lupinus albus* L. (B) bei Anzucht mit 250 μM NO_3^- unter K-Mangel. Die Peaks sind folgenden Anionen zuzuordnen: HPO_4^- 3.5 min, NO_3^- 10,5 min, SO_4^{2-} 13,5 min, Säuren 18-22 min.

4.6 Wechselwirkungen zwischen Nitrataufnahme, Kaliumangebot und der Verlagerung von Assimilaten

4.6.1 Einfluss des Nitrat-Angebots auf die CO₂-Fixierung und CO₂-Verlagerung

Brassica napus L. wurde bis zum 2-Blatt-Stadium in Nährlösung mit 250 µM NO₃⁻ bzw. 2,5 mM NO₃⁻ angezogen, wobei der pH-Wert des Mediums über einen pH-Stat auf 5,6 gehalten wurde. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in derselben Klimakammer, so dass die sonstigen Kulturbedingungen identisch waren. Etwa 12 h vor Versuchsbeginn wurden die Pflanzen in die Versuchsanordnung (Abbildung 5, S.33) zur Applikation von radioaktiv markiertem ¹⁴CO₂ eingesetzt. So hatten die Pflanzen Gelegenheit, sich an das neue Versuchssystem zu adaptieren. Der Einfluss von Stressfaktoren, die beim Einsetzen der Pflanzen in die Blattröhrchen die CO₂-Aufnahme verfälschen könnten, wurde so minimiert. Aus versuchstechnischen Gründen wurden jeweils 2 Rapspflanzen in eine Blattröhre eingesetzt.

Am Versuchstag wurde, 3 h nach Beginn der Photoperiode, eine 1-stündige ¹⁴CO₂-Markierung vorgenommen. Nach der Markierung wurde die im geschlossenen System befindliche Luft über eine NaOH-Waschflasche ausgeblasen und durch nicht markierte Umgebungsluft ersetzt. In den folgenden 48 h wurde die Abgabe von ¹⁴CO₂ über die Blätter und Wurzeln verfolgt.

Tabelle 28: Einfluss des NO₃⁻-Angebots auf die Verlagerung von ¹⁴CO₂ in *Brassica napus* L. nach einer 1 h Markierung. Die Pflanzen wurden 48 h nach dem ¹⁴CO₂-Puls geerntet und die Verteilung des aufgenommenen ¹⁴C bestimmt. Neben dem in den Pflanzen verbliebenen ¹⁴C wurde auch die Abgabe in die Luft bzw. das Nährmedium gemessen.

Variante	A	B	C
N-Angebot	250 µM NO ₃ ⁻	250 µM NO ₃ ⁻	2500 µM NO ₃ ⁻
K-Angebot	700 µM K ⁺	10 d ohne K ⁺	700 µM K ⁺

Anteil des aufgenommenen ¹⁴C, der nach 2 d noch in den Pflanzen verblieben ist*

Blatt	61,5%	60,6%	66,8%
Spross	9,2%	9,8%	8,7%
Wurzel	11,9%	14,4%	9,0%
¹⁴ C in der Pflanze insgesamt	82,5%	84,8%	84,5%

¹⁴C-Anteil, der 2 d nach dem 1 h ¹⁴CO₂-Puls von den Pflanzen wieder abgegeben wurde*

Photorespiration und Dunkelrespiration	8,9%	2,5%	6,7%
Abgabe über die Wurzel	8,6%	12,7%	8,7%
wieder abgegebenes ¹⁴ C	17,5%	15,2%	15,5%

* Gesamtaufnahme = 100%

Während der Markierung wurden zwar über 95 % des applizierten $^{14}\text{CO}_2$ aufgenommen, jedoch unterschieden sich die Varianten in ihrer spezifischen Aufnahmerate. Mit einer Applikation wurden immer 2 verschiedene Varianten mit $^{14}\text{CO}_2$ markiert, wodurch der direkte Vergleich der Aufnahmeraten ermöglicht wurde. Die Variante A (Tabelle 29), welche mit $250\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ und ausreichend K^+ angezogen wurde, zeigte die höchste Aufnahmerate in $\text{CPM} / \text{g FM}_{\text{Blatt}}$. Die mit $2,5\ \text{mM}\ \text{NO}_3^-$ ernährte Variante (C) zeigte eine spezifische Aufnahmerate, die um 10% niedriger lag. Auch die K-Mangelvariante (B) lag um 8-10% unter der Aufnahmerate der Variante A.

In den **Blättern** der mit $250\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ angezogenen Pflanzen (A+B) ist 2 d nach der Applikation noch ca. 61% (Tabelle 28, S.96) des aufgenommenen ^{14}C nachweisbar. Die Pflanzen mit höherer N-Versorgung (C) haben mit 66,8% einen etwas höheren Anteil des Aufgenommenen ^{14}C in den Blättern gehalten, was dafür spricht dass in dieser Variante mehr $^{14}\text{CO}_2$ zum Aufbau der Biomasse der Blätter verwendet wurde und weniger Assimilate in Richtung von Spross oder Wurzel weitergeleitet wurden.

Im **Spross** lassen sich nach 2 in allen Varianten ca. 9% des aufgenommenen ^{14}C wieder finden.

In die **Wurzel** von Variante C ($2500\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$) ist mit nur 9% deutlich weniger ^{14}C verlagert worden, als bei den mit $250\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ ernährten Pflanzen. Die Wurzeln

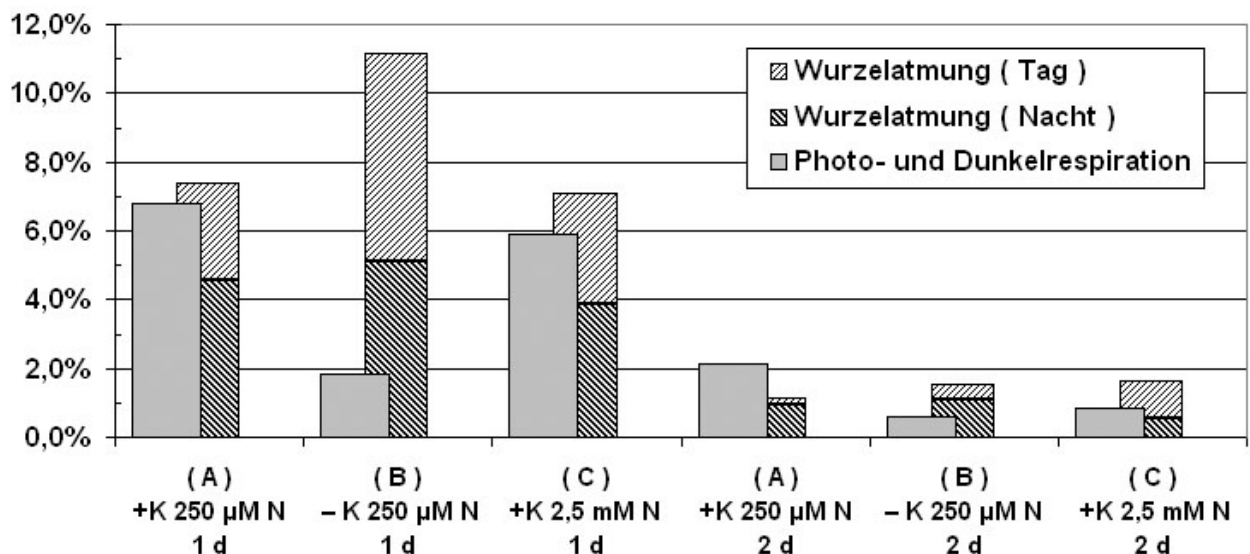


Abbildung 28: Abgabe von ^{14}C über die Blätter und die Wurzeln von *Brassica napus* L. nach einem 1 h Puls. Es ist angegeben welcher Anteil des ursprünglich aufgenommenen $^{14}\text{CO}_2$ 1 d (links) bzw. 2 d (rechts) nach der Applikation durch Blatt- oder Wurzelatmung wieder von den Pflanzen an das Außenmedium abgegeben wurde.

Variante C (K-Mangel) hat mit 14,4% des aufgenommenen ^{14}C mehr Assimilate erhalten als die Wurzeln der mit K^+ versorgten Variante A (11,9%).

Der Anteil des über die **Blattatmung** wieder freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ ist in Variante B mit 2,5% am geringsten. Bei den mit K^+ -versorgten Varianten wurden bei hohem N-Angebot 6,7% (C) und in Variante A 8,9% wieder abgegeben. In Variante C ist die Abnahme von ^{14}C durch Blattatmung innerhalb der ersten 24 h am größten (Abbildung 28). Mit 6,8% werden in diesem Zeitraum 88% des insgesamt über die Blätter abgegebenen $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt. Bei den Varianten A und B fällt die 1 d nach der Applikation durch Blattatmung abgegebene ^{14}C -Menge etwas niedriger aus. Sie liegt lediglich bei 75% des insgesamt über die Blätter abgegebenen $^{14}\text{CO}_2$.

Durch **Wurzelatmung** werden in den Varianten A und C 8,6-8,7% des aufgenommenen ^{14}C wieder abgegeben. In Variante A entfallen dabei 86,5% auf die ersten 24 h nach der Applikation, während bei Variante C (2,5 mM NO_3^-) in dieser Zeit nur 81,4% in die Nährlösung abgegeben werden. Variante B (K-Mangel) zeigt mit 12,7% die höchste Abgabe über die Wurzel. Etwa 88% des abgegebenen ^{14}C entfallen dabei auf die ersten

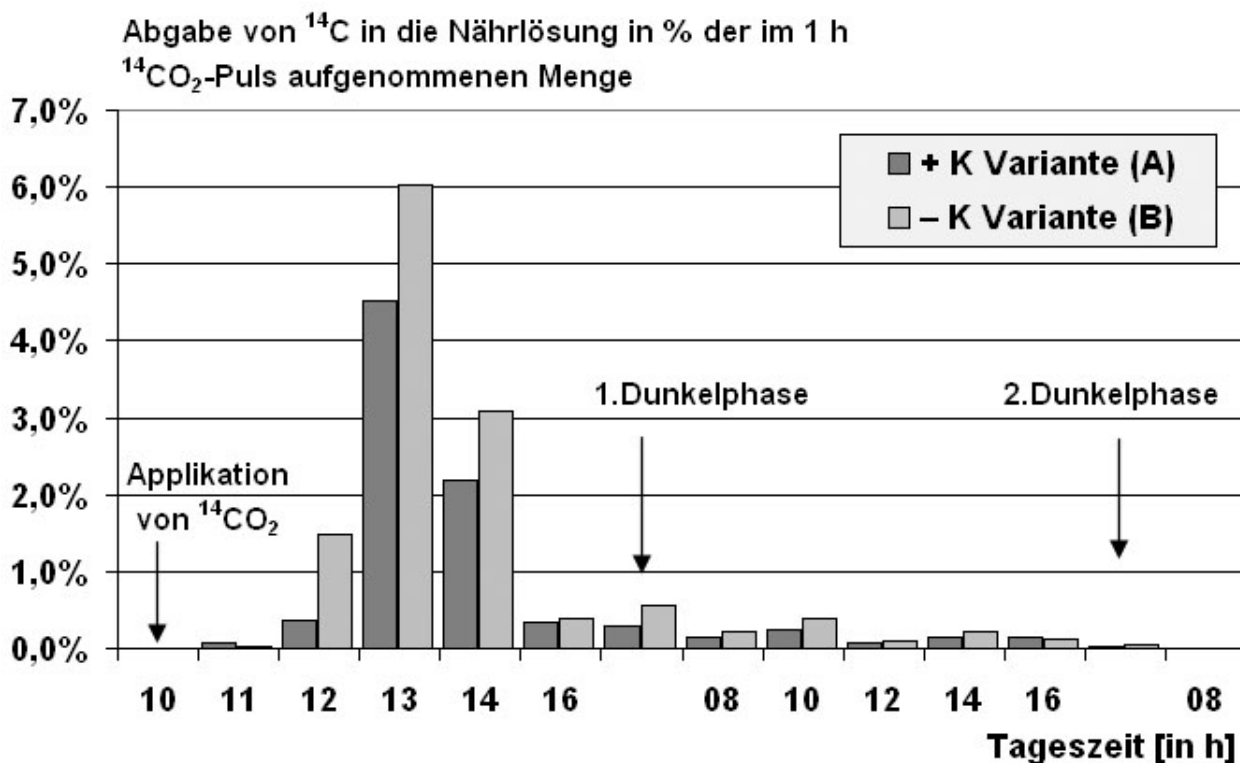


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Abgabe von ^{14}C in über die Wurzeln von *Brassica napus* L. nach einer 1 h Markierung von $^{14}\text{CO}_2$ über die Blätter. Die Pflanzen wurden mit 250 μM NO_3^- angezogen und entweder kontinuierlich mit 700 μM K^+ (+K-Variante) ernährt, oder für 10 d auf Medium ohne K^+ (-K-Variante) gesetzt.

24 h nach Applikation.

Für Variante A und B wurde die Abgabe von ^{14}C über die Wurzel in das Nährmedium auch in einer engeren zeitlichen Auflösung verfolgt (Abbildung 29). 1 h nach Ende des Applikationspuls steigt die Abgabe von ^{14}C über die Wurzeln an und erreicht zwischen 2 h und 3 h nach Applikationsende ein Maximum und geht nach 4h deutlich zurück. Die ^{14}C -Abgabe bei der K-Mangelvariante (B) fällt dabei stärker aus, als bei den kontinuierlich mit K^+ -ernährten Pflanzen. Etwa 75% des insgesamt über die Wurzeln abgegebenen ^{14}C gelangen zwischen 2h und 4h nach Ende der Markierung in das Nährmedium. Bis zur 2.Dunkelphase nach der $^{14}\text{CO}_2$ -Applikation bleibt die Abgabe über die Wurzeln auf einem niedrigen Niveau und geht dabei stetig zurück. 2 d nach der Applikation ist eine weitere Wurzelabgabe kaum noch nachweisbar.

Trotz teils deutlicher Unterschiede in ^{14}C -Verteilung und -Abgabe ist den Varianten B und C jedoch gemein, dass sich 2 d nach der $^{14}\text{CO}_2$ -Puls-Markierung noch 84,5% des ^{14}C in den verschiedenen Fraktionen der Pflanzen befinden. Einen nur geringfügig niedrigeren Wert zeigt Variante A mit 82,5% (Tabelle 28).

4.6.2 Verlagerung von ^{11}C bei *Brassica napus* L.

Rapspflanzen wurde mit $250\text{ }\mu\text{M NO}_3^-$ angezogen, wobei eine Variante 10 d vor Versuchsbeginn auf ein Medium ohne K^+ umgesetzt wurde. Pflanzen im 2-Blatt Stadium wurden, 1 d vor Versuchsbeginn, in die in Abbildung 6 dargestellte Apparatur gebracht. Die verwendeten γ -Detektoren waren unterschiedlich weit von der zu erfassenden Quelle entfernt, sodass bei den aufgenommenen Kurven nicht die absoluten Messwerte, sondern der Kurvenverlauf eine Rolle spielt. Jeder Detektor war so abgeschirmt, dass er nur die γ -Strahlung der ihm zugeordneten Fraktion messen konnte.

Mit der Applikation von $^{11}\text{CO}_2$ steigt der Messwert des Detektors am Luftkreislauf der Pflanzen sprunghaft an (Abbildung 30) und wird, während der gesamten Versuchsdauer, durch die in Abbildung 5 dargestellte Gaswechselapparatur auf konstantem Niveau gehalten.

Beim **Blatt**-Detektor findet zwar eine Überlagerung des $^{11}\text{CO}_2$ in der Luft mit dem bereits aufgenommenen ^{11}C statt, jedoch führt nur das tatsächlich aufgenommene ^{11}C zum Kurvenanstieg. Dies lässt sich dadurch belegen, dass beim Ausblasen des $^{11}\text{CO}_2$

der Messwert des Detektors am Luftkreislauf innerhalb von 1 min auf die Basislinie zurückfällt, während der Blatt-Detektor eine typische exponentielle Zerfallskurve aufzeichnet.

Der Anstieg der Zählraten der Blatt-Detektoren erfolgt bei +K- und -K-Variante etwa gleich schnell. Der Blatt Detektor erreicht bei beiden Varianten nach 15 min einen Messwert, der 50% des späteren Plateaus (bzw. des linear ansteigenden Teils) der Kurve entspricht (Tabelle 29).

Wird einer -K-Variante 2 h nach Applikationsbeginn K⁺ im Nährmedium angeboten, so macht sich dies im Verlauf der Messkurve nicht durch einen zusätzlichen Anstieg im linearen Teil der Kurve bemerkbar. Erst am Ende des Versuchs, nach dem Ausblasen des ¹¹CO₂ aus dem Pflanzenkreislauf lassen sich Unterschiede erkennen (Tabelle 29). Die Pflanzen können jetzt kein frisches ¹¹C mehr aufnehmen, sondern nur noch das aufgenommene ¹¹C über die Blätter an die Umgebung abgeben oder über den Spross an andere Kompartimente weiterleiten. Nach Zerfallskorrektur der Messwerte zeigt sich, dass in allen 3 Varianten nach Applikationsende ein Export von ¹¹C bzw. ¹¹C-Assimilaten stattfindet.

Bei der +K-Variante beträgt die Export-Rate 8% des Gesamt-¹¹C/10 min. Die -K-Variante verlagert mit nur 5% des ¹¹C-Pools/10 min deutlich weniger. Die -K-Pflanzen,

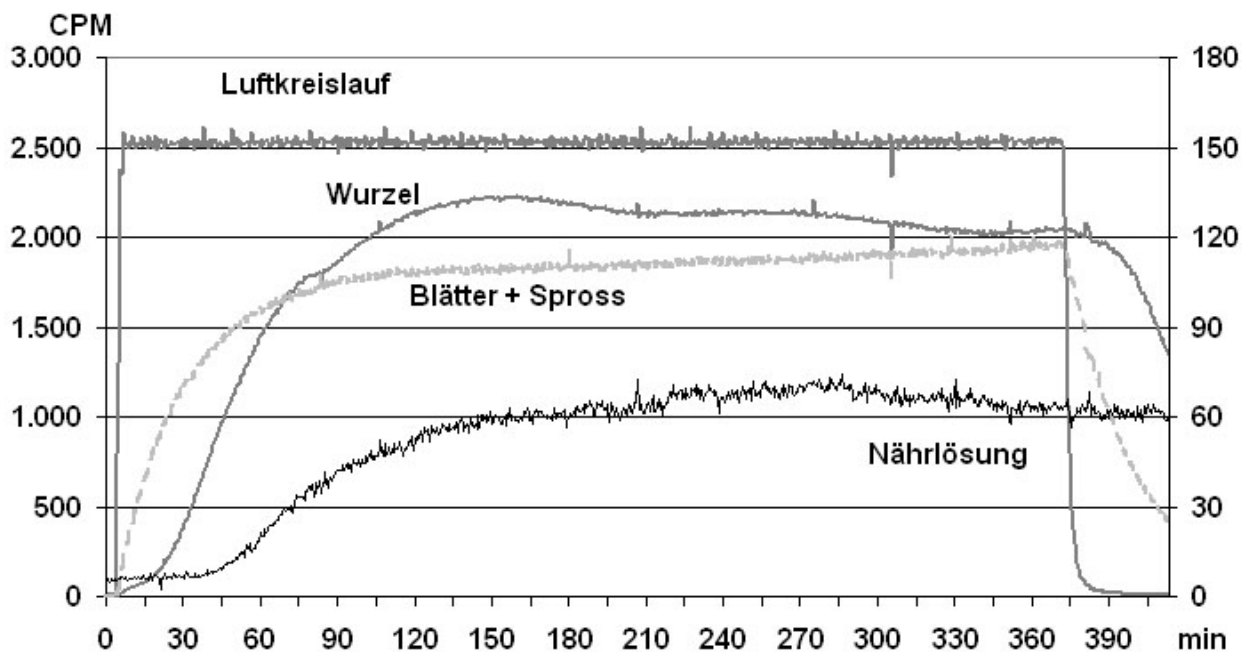


Abbildung 30: Bestimmung der Aufnahme und Verlagerung von ¹¹CO₂ bei *Brassica napus* L. Die untersuchten Pflanzen befanden sich im 2-Blatt-Stadium und waren mit 250 µM NO₃⁻ und 700 µM K⁺ ernährt.

welche während des Versuchs für 4 h eine K-Ernährung erfahren hatten, zeigen eine Exportrate von 7% des Pools / 10 min, die fast das Niveau der +K-Variante erreicht.

Beim **Wurzel**-Detektor kommt es zu einer Überlagerung der γ -Strahlung aus den Wurzeln und der in der Wurzelküvette befindlichen Nährlösung. Wie der Vergleich mit dem Nährlösungs-Detektor zeigt (Abbildung 30), spielt dies jedoch keine Rolle, da zu Versuchsbeginn die Nährlösung noch kein ^{11}C enthält und γ -Strahlung der Nährlösung in Laufe des Versuchs nur langsam zunimmt.

Sowohl bei +K, als auch bei der -K-Variante steigen die Messwerte in der Wurzel sofort nach Applikationsbeginn an. Eine Lag-Phase tritt nicht auf. Der Anstieg erfolgt bei der +K-Variante allerdings deutlich schneller als bei der -K-Variante. So werden in der +K-Variante bereits nach 43 min 50% eines späteren Plateau-Wertes erreicht, während bei der -K-Variante 62 min benötigt werden um 50% des Plateaus zu erreichen (Tabelle 29). Die NO_3^- -Aufnahme der +K-Variante ist mit $20,8 \mu\text{M/g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$ ca. 14% höher als die der -K-Variante ($18,3 \mu\text{M/g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$). Eine K^+ -Aufnahme konnte bei der -K-Variante nicht gemessen werden. Bei den für 4 h mit K^+ versorgten Pflanzen liegt

Tabelle 29: Einfluss von K^+ auf die Verlagerung von ^{11}C in *Brassica napus* L. Die Versuchspflanzen waren mit $250 \mu\text{M NO}_3^-$ angezogen worden und befanden sich im 2-Blatt-Stadium. Als $\text{CPM}_{50\% \text{ max}}$ wird hier die Zeitspanne angegeben, die verstrichen ist, bis ein Detektor 50% des höchsten Messwertes erreicht hat.

Anzuchtbedingungen	+K	-K	-K
Versuchsbedingungen	+K	-K	-K, aber 2 h nach Applikationsbeginn Nährmedium auf $700 \mu\text{M K}^+$ eingestellt
Anzahl Versuchspflanzen	4	4	2
Blatt + Spross			
$\text{CPM}_{50\% \text{ max}}$ Änderung des ^{11}C -Pools nach Applikationsende (zerfallskorrigiert)	14-15 min - 8 %	15-16 min - 5%	- - 7 % / 10 min
Wurzel			
$\text{CPM}_{50\% \text{ max}}$ mittlere K^+ -Aufnahme mittlere NO_3^- -Aufnahme Änderung des ^{11}C -Pools nach Applikationsende (zerfallskorrigiert)	42-44 min 0,95 20,8 + 31 %	61-63 min - 18,3 + 27 %	- 0,89 $\mu\text{M K}^+ / \text{g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$ 19,0 $\mu\text{M NO}_3^- / \text{g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$ + 34 % / 10 min
Nährlösung			
Verzögerung bis zum Anstieg der Messwerte $\text{CPM}_{50\% \text{ max}}$ Änderung des ^{11}C -Pools nach Applikationsende (zerfallskorrigiert)	32-34 min 65-67 min + 42%	32-34 min 65-67 min + 35%	- - +44 % / 10 min

die K^+ -Aufnahme mit $0,89 \mu\text{M/g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$ aber schon auf hohem Niveau und erreicht 94% der Aufnahme rate der +K-Pflanzen.

Werden die Messwerte nach Applikationsende zerfallskorrigiert, so ist in allen Varianten ein deutlicher Anstieg des ^{11}C -Pools der Wurzel festzustellen. Bei der +K-Variante liegt die Zunahme mit +31%/10 min über der Zunahme der -K-Variante (+27%/10 min). Noch stärker fällt jedoch mit +34%/10 min die Zunahme des ^{11}C -Pools der Pflanzen aus, die nach K+-Mangel für 4 h ein Medium mit K+ erhalten hatten.

Die Abgabe von ^{11}C an die **Nährlösung** erfolgt bei allen Varianten mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 33 min nach Applikationsbeginn. Ein Unterschied zwischen -K und +K-Variante ist nicht erkennbar.

Auch das Erreichen von 50% des späteren Plateau-Wertes erfolgt in allen Varianten nach derselben Zeitspanne, ca. 66 min.

Nach Applikationsende ist in der Nährlösung (nach Zerfallskorrektur) in allen Varianten eine deutliche Zunahme der Menge von ^{11}C zu erkennen. Die Zunahme beträgt in der +K-Variante +44% / 10 min und sie liegt damit um 20% über der Zunahme der -K-Variante mit 35% / 10 min. Wie schon bei der Wurzel, so verzeichnet auch bei der Nährlösung die Variante, welche erst 4 h mit K+ in Kontakt ist, den stärksten Anstieg (+44% / 10 min).

4.7 Bestimmung von L-Malat

4.7.1 Extraktionsbedingungen für Raps

Der auf S.39 beschriebene Nachweis von L-Malat eignet sich zur Bestimmung der L-Malatkonzentration in festen Pflanzenproben, die nach dem Homogenisieren mit Wasser extrahiert werden. Unter welchen Extraktionsbedingungen der Test die zuverlässigsten Ergebnisse liefert, war jedoch noch zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurden in einem Vorversuch 6 Rapspflanzen geerntet, gemeinsam homogenisiert und der Rohextrakt aus den Blättern, der Sprossachse und den Wurzeln gewonnen. Aliquote der 3 Rohextrakte wurden daraufhin zwischen 5 und 60 min bei 60°C mit Wasser extrahiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bis zu einer Extraktionsdauer von 15 - 20 min die Menge des bestimmbar L-Malats in den Proben anstieg, bei einer längeren Extraktionsdauer aber kaum noch eine weitere Zunahme des bestimmbar L-Malats erkennbar war. Anhand dieser Beobachtungen wurde die Extraktionsdauer für die Versuche auf 20 min festgesetzt.

In einem ersten Versuch wurde untersucht, welchen Einfluss die Extraktionsdauer bei

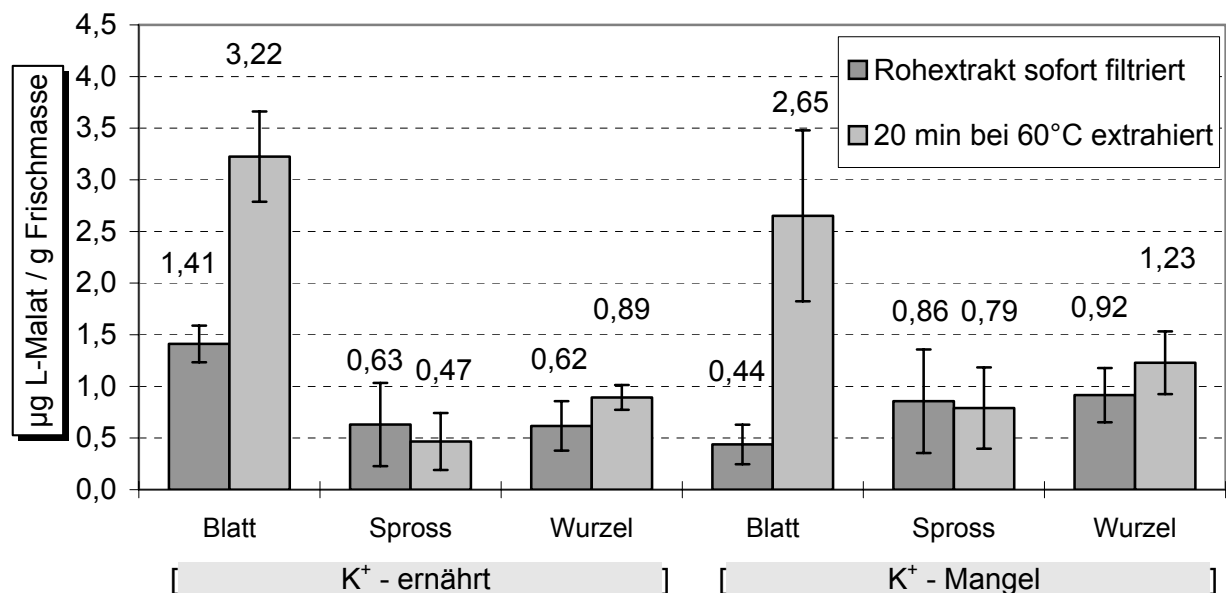


Abbildung 31: Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die Bestimmung des Gehaltes von L-Malat in *Brassica napus* L. cv. Liberator-00.

Für beide Varianten (links: Ernährung mit 700 µM K⁺; rechts K⁺-Mangel) wurden je 24 Pflanzen für die L-Malatbestimmung eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert dar. Zum Zeitpunkt des Tests waren die Versuchspflanzen 21 d alt.

Rapspflanzen auf die Schwankungsbreite der Messwerte hat. Dazu wurden jeweils 24 Rapspflanzen in der Mitte der Photoperiode geerntet und homogenisiert. Die Hälfte der so gewonnenen Rohextrakte wurde sofort für die L-Malatbestimmung eingesetzt, während die restlichen Rohextrakte noch 20 min bei 60°C extrahiert wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 31 dargestellt.

Bei der Bestimmung der L-Malatkonzentration in der Sprossachse und in den Wurzeln von Raps zeichneten sich nur geringe Unterschiede zwischen den Rohextrakten und den bei 60°C extrahierten Proben ab. Es fällt jedoch auf, dass die Standardabweichung der Messwerte (in % des Mittelwertes) bei den Rohextrakten höher liegt als bei den zusätzlich erhitzten Proben. Ein sehr großer Unterschied war in der Bestimmung der L-Malatgehalte in den Blättern festzustellen, wo in den erhitzten Proben Werte bestimmt wurden, die um das zweifache (K^+ -Ernährung) bis sechsfache (K^+ -Mangel) der Werte der Rohextrakte erreichten. Die höheren Werte bei der Bestimmung des L-Malats in den erhitzten Rohextrakten zusammen mit der Tatsache, dass die Rohextrakte eine höhere Standardabweichung aufwiesen, sprachen dafür, in weiteren Tests die Rohextrakte bei 60°C zu extrahieren.

Die gerade beschriebenen Vorversuche ließen bereits Unterschiede zwischen K^+ -ernährten und K^+ -Mangelpflanzen erkennen, auf die in den folgenden Versuchen näher eingegangen wurde.

4.7.2 Nitrat-Angebot und L-Malatgehalt von Raps

Um Informationen darüber zu erhalten, ob sich das Nitrat-Angebot auf die L-Malatgehalte auswirkt, wurden zwei Versuche durchgeführt.

Im ersten Versuch wurden die Auswirkungen einer Reduktion des Nitratangebotes untersucht. Dazu wurden Rapspflanzen mit 2 mM Nitrat angezogen und dann 6 h bis 48 h vor der Ernte auf eine Nährlösung mit 150 μM NO_3^- umgesetzt (Abbildung 32, S.105). Die NO_3^- -Konzentrationen waren dabei so gewählt, dass die Pflanzen ihr Nitrat-Aufnahmesystem vom LATS (bei 2 mM NO_3^-) auf das HATS (bei 150 μM NO_3^-) umstellen mussten.

Auf die Verminderung des NO_3^- -Angebotes reagierten die Rapspflanzen nach 6 h mit einer Zunahme der L-Malatgehalte in den Wurzeln von 0,80 auf 1,07 μg L-Malat / g FM (Abbildung 32). Da die L-Malatgehalte der Blätter und der Sprossachse eine geringe Abnahme verzeichnen, ist anzunehmen, dass eine Verlagerung von L-Malat in Richtung

der Wurzel stattfand. Eine mögliche Erklärung bietet der höhere Energiebedarf der Wurzel, die nun einen erhöhten Energieverbrauch hat, da sie die Nitrataufnahme entgegen dem Konzentrationsgradienten aufrechterhalten muss. Als ein Substrat, das im Rahmen der Wurzelatmung zur Gewinnung metabolischer Energie in Frage kommt, steht das L-Malat zur Verfügung.

Bis 24 h nach dem Umsetzen auf die Nährlösung mit dem geringeren NO_3^- -Gehalt nimmt der L-Malatgehalt in den Rapsblättern weiter ab, jedoch ohne dass sich der L-Malatgehalt in den Wurzeln weiter erhöht (Abbildung 32). Bei Pflanzen, denen der Spross zum Zeitpunkt des Nährlösungswechsels abgetrennt wurde, ist ein deutlicher Rückgang des L-Malatgehaltes (von 0,80 auf 0,27 μg L-Malat/g FM) in den Wurzeln zu beobachten. In den Wurzeln der dekapitierten Pflanzen wurde demnach der L-Malat-Pool aufgebraucht, um physiologisch wichtige Prozesse aufrecht zu erhalten. Ohne den Nachschub von niedermolekularen C-Verbindungen aus dem Spross, ist die Wurzel nicht in der Lage, den L-Malat-Pool auf einem hohen Niveau zu halten.

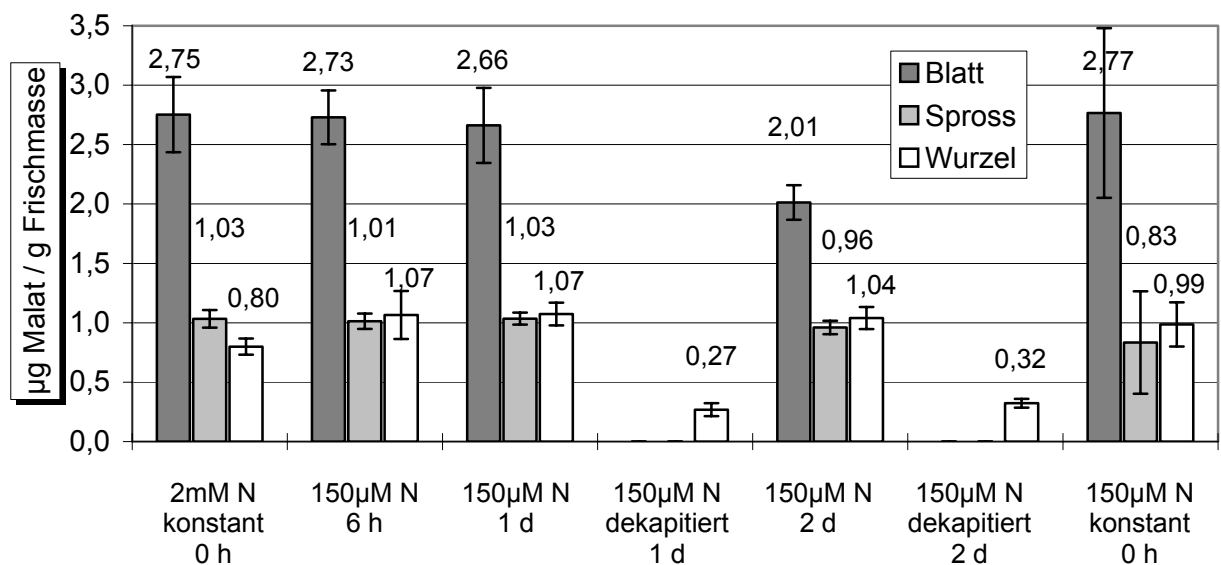


Abbildung 32: Einfluss einer **Reduktion** des Nitratangebotes auf die L-Malatgehalte von Raps (*Brassica napus* L.).

Die Pflanzen wurden mit 2 mM NO_3^- angezogen und im Laufe des Versuches auf eine Nährlösung mit 150 μM NO_3^- umgesetzt. Damit alle Pflanzen am gleichen Tag in der Mitte der Photoperiode geerntet werden konnten, erfolgte das Umsetzen der Versuchspflanzen auf die neue Nährlösung zwischen 6 und 48 h vor der Ernte.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte von je 12 Pflanzen (9 Pflanzen bei den dekapitierten Pflanzen) an. Zur Ernte hatten die Pflanzen ein Alter von 19 d erreicht.

Nach 2 d unter niedriger NO_3^- -Ernährung ist eine starke Abnahme der L-Malatkonzentration in den Blättern festzustellen (Abbildung 32). Da dieser Messwert deutlich unter den L-Malatgehalten der Blätter von kontinuierlich mit $150 \mu\text{M}$ NO_3^- ernährten Rapspflanzen liegt, stellt sich die Frage, ob es sich um einen „Ausreißer“ oder um einen fortgesetzten Trend handelt, der sich später wieder umkehrt. Der Messwert unterscheidet sich jedoch signifikant (5% Niveau, t-Test) von den L-Malatgehalten in den Blättern der $150 \mu\text{M}$ NO_3^- - und der 2 mM NO_3^- -Variante, was gegen einen „Ausreißer“ spricht.

Bei den **dekapitierten Pflanzen** ist der L-Malatgehalt nach 2 d gegenüber dem Wert am ersten Tag nach dem Umstellen der NO_3^- -Ernährung leicht angestiegen. Mit dem t-Test kann jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Werden die im **steady state** ermittelten L-Malatgehalte der $150 \mu\text{M}$ - und 2 mM NO_3^- -Variante verglichen (Abbildung 32), so sind die Werte in den Blättern nahezu identisch ($2,77 / 2,75 \mu\text{g}$ L-Malat/g FM). Der in der Sprossachse der $150 \mu\text{M}$ NO_3^- -Variante ermittelte L-Malatgehalt liegt mit $0,83 \mu\text{g} / \text{g}$ FM deutlich unter dem für die 2 mM -Variante ermittelten Wert von $1,03 \mu\text{g}$ L-Malat / g FM. Mit Hilfe des t-Tests lässt sich dieser Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % absichern. Der Unterschied im L-Malatgehalt der Wurzeln lässt sich ebenfalls statistisch absichern (1 % Niveau, t-Test). Hier liegt der L-Malatgehalt der $150 \mu\text{M}$ -Variante mit $0,99 \mu\text{g/g}$ FM über dem Wert der 2 mM -Variante ($0,80 \mu\text{g} / \text{g}$ FM).

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wie sich die L-Malatgehalte von Rapspflanzen bei einer Steigerung des NO_3^- -Angebotes verändern. In dieser Versuchseinstellung konnten die Pflanzen vom stark energieabhängigen HATS der Nitrataufnahme zum LATS übergehen.

In den **Blättern** stieg der L-Malatgehalt nach dem Umsetzen auf 2 mM NO_3^- langsam an (Abbildung 33, S.107), erreichte nach 1 d ein Maximum von $3,05 \mu\text{g}$ L-Malat/g FM, um dann langsam wieder abzunehmen. Trotz der deutlichen Zunahme des L-Malatgehaltes lässt sich dieser Anstieg nicht statistisch absichern. Am zweiten Tag nach der Umstellung der N-Ernährung wurde der mittlere L-Malatgehalt mit $2,83 \mu\text{g/g}$ FM bestimmt und lag somit noch über dem Wert der kontinuierlich mit 2 mM NO_3^- ernährten Pflanzen.

Die Sprossachse zeigt bereits 6 h nach dem Umstellen auf 2 mM NO_3^- einen

signifikanten Anstieg (5 % Niveau, t-Test) des L-Malatgehaltes (Abbildung 33). Mit 1,11 μg L-Malat / g FM liegt der Wert deutlich über den Werten, die an Pflanzen ermittelt wurden, die kontinuierlich mit 2 mM NO_3^- ernährt wurden. Bis 48 h nach dem Nährlösungswechsel sinken die L-Malatgehalte wieder und erreichen nahezu den Wert der 2 mM-Variante.

Eine sehr deutliche Reaktion zeigen die **Rapswurzeln** bei der Umstellung des NO_3^- -Angebotes. Bereits nach 6 h lässt sich eine signifikante Abnahme (1 % Niveau, t-Test) des L-Malatgehaltes feststellen, die sich bis zur Probennahme nach 1 d auf dem neuen Medium fortsetzt. Mit 0,66 μg L-Malat / g FM hat die L-Malat-Konzentration in den Wurzeln ein Minimum erreicht, beginnt wieder anzusteigen und erreicht nach 2 d auf der neuen Nährlösung fast den Wert der 2 mM-Variante.

Werden die L-Malatgehalte der dekapitierten Pflanzen betrachtet (Abbildung 33), so wird deutlich, dass die Wurzeln von sich aus keinen deutlichen Anstieg der L-Malatkonzentration bewirken können. Nach dem Entfernen des Sprosses wird hier der

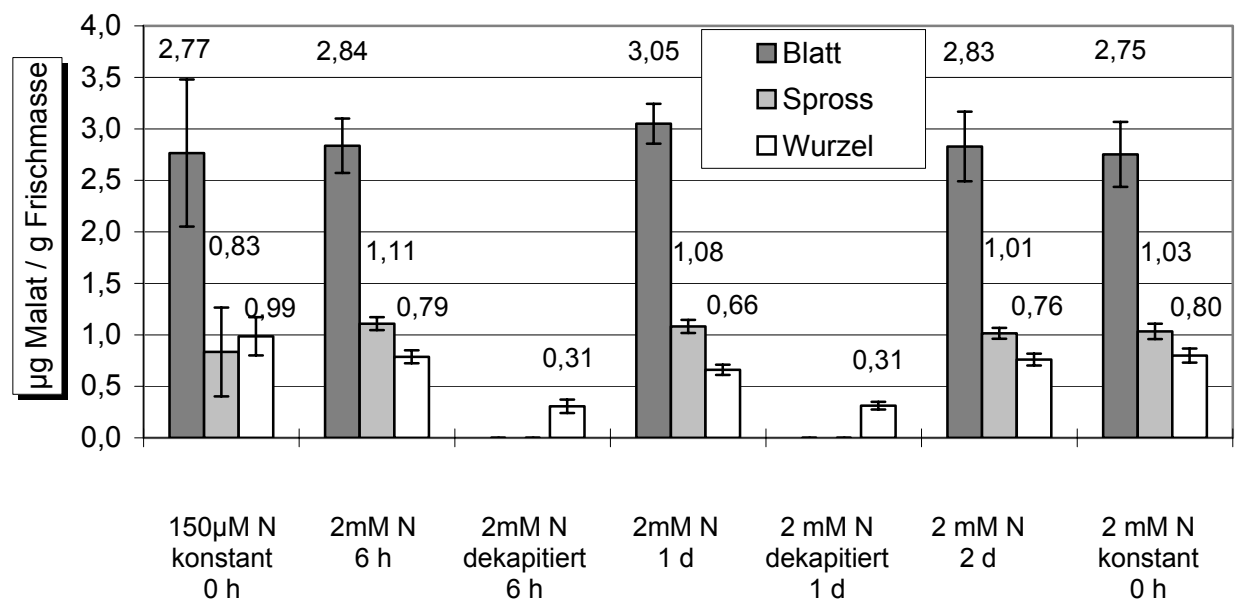


Abbildung 33: Einfluss einer **Steigerung** des Nitratangebotes auf die L-Malatgehalte von Raps (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden mit 150 μM NO_3^- angezogen und im Laufe des Versuches auf eine Nährlösung mit 2 mM NO_3^- umgesetzt. Das Umsetzen der Pflanzen erfolgte 6 bis 48 h vor der Ernte, damit alle Pflanzen am gleichen Tag in der Mitte der Photoperiode geerntet werden konnten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte von je 12 Pflanzen (9 Pflanzen bei den dekapitierten Pflanzen) an. Am Tag der Ernte waren die Pflanzen 21 d alt.

L-Malat-Pool abgebaut und kann nur durch den Abbau von Speicherstoffen auf einem niedrigen Niveau gehalten werden.

4.7.3 Kalium-Angebot und L-Malatgehalt von Raps

Nach dem Modell von **Ben Zioni** (1971) spielt Kalium bei der Nitrataufnahme eine wesentliche Rolle, da es als Gegenion zu Nitrat im Xylem transportiert wird. Während das Nitrat in den Blättern reduziert wird, kann Kalium zusammen mit L-Malat wieder zu den Wurzeln transportiert werden. Da die Nitrataufnahme mit einer Abgabe von HCO_3^- verbunden ist und die Nitraternährung auch die L-Malatkonzentration in der Pflanze beeinflusst, lag es nahe, auch den Einfluss von Kalium auf den L-Malatgehalt von Raps zu betrachten.

Zu diesem Zweck wurden Rapspflanzen auf K^+ -freier Nährlösung mit $150 \mu\text{M NO}_3^-$ angezogen. Zwischen 3 h und 2 d vor Versuchsbeginn wurden in der Klimakammer einige Pflanzen auf eine Nährlösung mit $700 \mu\text{M K}^+$ umgesetzt. Durch dieses Vorgehen

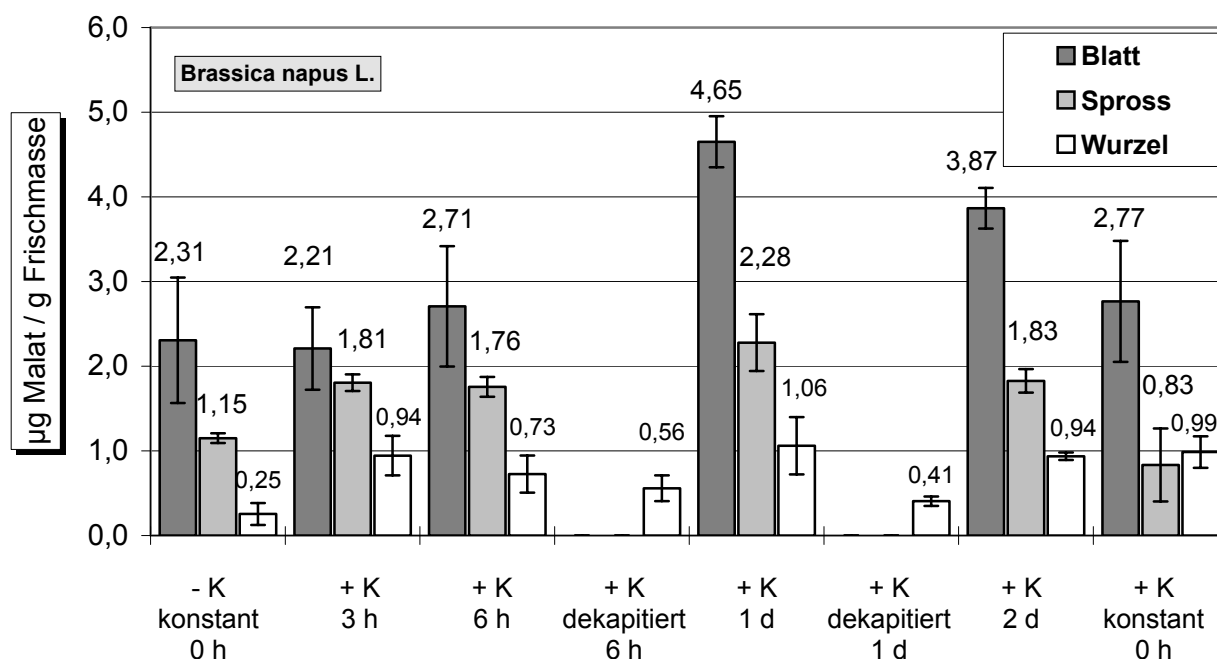


Abbildung 34: Einfluss von **Kalium** auf die L-Malatgehalte von Raps (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden über 14 Tage auf K^+ -freier Nährlösung angezogen und vor Versuchsbeginn auf eine Nährlösung mit $700 \mu\text{M K}^+$ umgesetzt. Um alle Pflanzen im gleichen Alter ernten zu können, wurden die Versuchspflanzen 6 h bis 2 Tage vor der Ernte auf die K^+ -Nährlösung umgesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der L-Malatgehalte von 9 (dekapitierte Pflanzen) bzw. 12 Parallelen an. Die Ernte erfolgte 22 d nach der Saat in der Mitte der Photoperiode.

wurde gewährleistet, dass mit Ausnahme der Kaliumernährung alle Pflanzen denselben Anzuchtbedingungen (Nährstoffe, Temperatur, Feuchte, Licht) unterlagen und sich im gleichen Entwicklungsstadium befanden. Die Ernte aller Pflanzen erfolgte in der Mitte der Photoperiode des 22. Tages nach der Saat (Abbildung 34, S. 108).

In den **Blättern** der Rapspflanzen ist in den ersten 3 h nach Kontakt mit K^+ keine signifikante Änderung der Konzentration von L-Malat zu beobachten. In den folgenden 3 h steigt der L-Malatgehalt von anfänglich 2,31 auf 2,71 $\mu\text{g} / \text{g FM}$ an (Signifikanz auf dem 1 % Niveau des t-Tests) und erreichte nach 1 d auf dem +K-Medium ein Maximum von 4,67 $\mu\text{g L-Malat} / \text{g FM}$. Am zweiten Tag mit +K-Ernährung geht der L-Malatgehalt auf 3,87 $\mu\text{g} / \text{g FM}$ zurück und nähert sich somit langsam dem Wert von kontinuierlich mit K^+ ernährten Pflanzen.

Über den Beobachtungszeitraum von 6 h bis 2 d nach dem Umsetzen auf das +K-Medium liegen die L-Malatgehalte der Blätter nicht nur signifikant über denen der -K-Variante (1 % Niveau, t-Test), sondern auch die Änderungen zwischen den Probenahmen sind statistisch abgesichert.

Die L-Malatgehalte im **Spross** der Rapspflanzen zeigen bereits nach 3 h einen signifikanten Anstieg des L-Malatgehaltes (1 % Niveau, t-Test), verändern sich aber dafür bis zur Probennahme 6 h nach dem Nährlösungswechsel kaum. Bis zum ersten Tag auf dem K^+ -Medium erfolgt zwar nochmals ein signifikanter Anstieg (1 % Niveau, t-Test) des L-Malatgehaltes der Sprossachse, jedoch geht der Wert am folgenden Tag wieder auf das Niveau zurück, das 6 h nach dem Kontakt erreicht war. Die Sprossachse zeigt somit zwar einen früheren Anstieg in den L-Malatgehalten als die Blätter, folgt aber dann den Veränderungen der Blätter.

Nach dem Umsetzen der Pflanzen auf die +K-Nährlösung ist in den **Wurzeln** der Rapspflanzen bereits nach 3 h ein signifikanter Anstieg (1 % Niveau, t-Test) des L-Malatgehaltes festzustellen (Abbildung 34). Zu den folgenden Probenahmen war keine signifikante Änderung festzustellen und die L-Malatgehalte der Wurzeln unterschieden sich kaum von denen kontinuierlich mit K^+ -ernährter Rapspflanzen.

Vergleicht man die L-Malatgehalte von Rapspflanzen, die im **steady state** aufgezogen

wurden (Abbildung 35), so lassen sich nur wenige statistisch signifikante Unterschiede zwischen einer -K-Variante, einer +K-Variante und einer mit 2 mM NO₃⁻ ernährten +K-Variante feststellen.

In den Wurzeln von **dekapitierten Pflanzen** lassen sich, unabhängig von den Kulturbedingungen, ca. 0,30 µg L-Malat / g FM feststellen. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten gibt es zwar nicht. Bei den +K-Varianten lässt sich jedoch eine signifikante Abnahme des L-Malatgehaltes gegenüber den nicht dekapitierten Pflanzen feststellen (1 % Niveau, t-Test).

Die L-Malatgehalte im **Spross** liegen bei allen Varianten zwischen 0,83 und 1,15 µg / g FM. Trotz dieser Schwankungsbreite lassen sich die Unterschiede zwischen den Varianten allerdings nicht statistisch absichern.

Während der L-Malatgehalt in den **Blättern** der +K-Varianten fast gleich ist, ist eine schwach signifikante Abnahme (5 % Niveau, t-Test) zu der -K-Variante festzustellen.

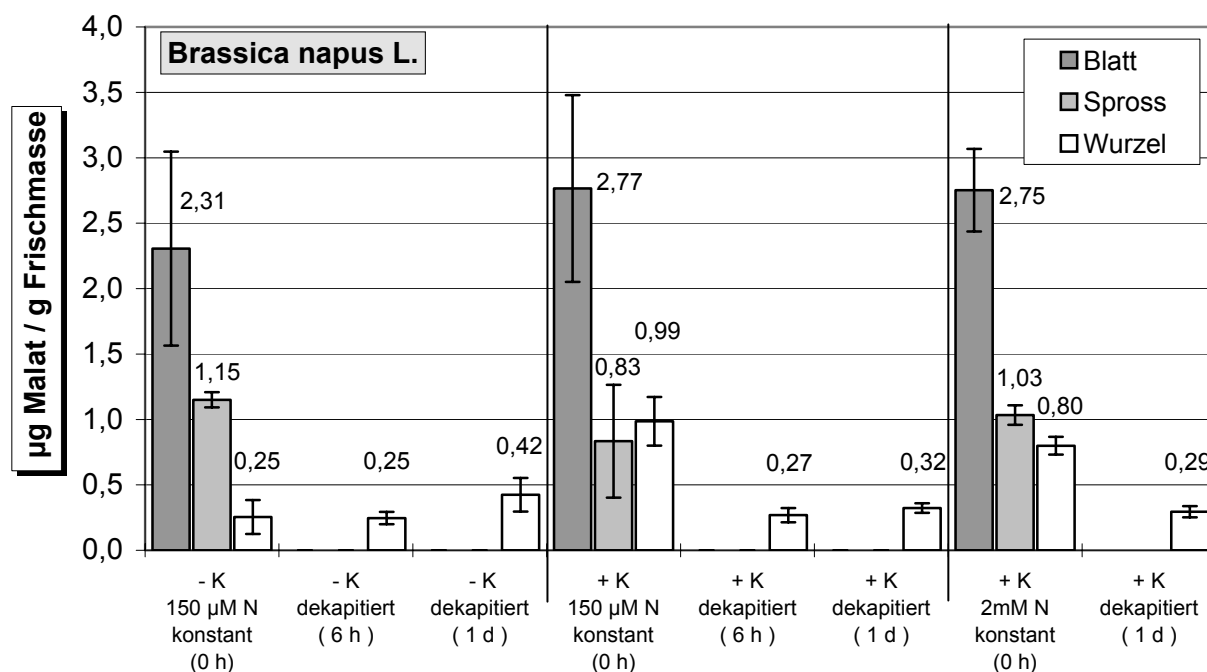


Abbildung 35: L-Malatgehalte von *Brassica napus* L. bei dekapitierten Pflanzen, unter Kaliummangel und K⁺-ernährten Pflanzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der L-Malatgehalte von 9 (dekapitierte Pflanzen) bzw. 12 Parallelen an.

4.7.4 Einfluss von K^+ auf den Gehalt von L-Malat im Gewebe von Lupinen

Bei den Versuchen zum Einfluss von K^+ auf den Gehalt von L-Malat in Lupinen wurden die Pflanzen auf einer Nährlösung angezogen, die $150 \mu\text{M NO}_3^-$ und $700 \mu\text{M K}^+$ enthielt. Um tageszeitliche Schwankungen in der L-Malatkonzentration auszuschließen wurden alle Versuchspflanzen in der Mitte der Photoperiode geerntet. Die Mangelvarianten wurden deshalb 2 h bis 48 h vor der Ernte auf ein K^+ -freies Medium gestellt. An 3 aufeinander folgenden Tagen wurden dann je 4 Kontrollpflanzen (K^+) und 3 Pflanzen pro Mangelvariante geerntet und für den L-Malat-Test verwendet. Die Ergebnisse der L-Malat-Bestimmungen sind in Abbildung 36 dargestellt.

Ähnlich wie *Brassica napus* L. reagiert auch *Lupinus albus* L. bei Kaliummangel mit einem Absinken des in der Pflanze nachweisbaren L-Malats. In den ersten 2 h auf dem Mangelmedium ist dieser Trend jedoch noch nicht zu beobachten, es kam sogar zu einem schwachen Anstieg der L-Malatkonzentration in Blatt und Wurzel. Dieser Anstieg war allerdings nur gering und wegen der hohen Standardabweichung der Messwerte

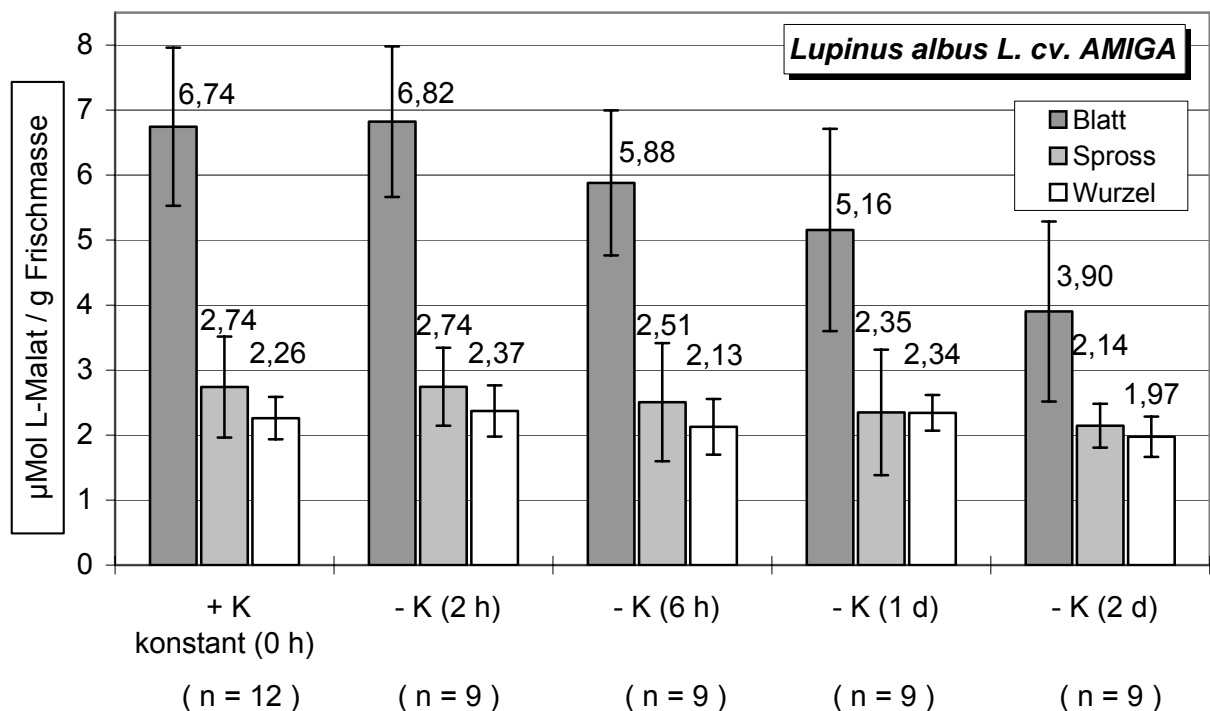


Abbildung 36: Abnahme der L-Malat-Konzentration in Blatt, Spross und Wurzel von **Lupinen**, die auf K^+ -Mangel umgesetzt wurden.

Die Gehalte von L-Malat wurden an 27 - 29 d alten Lupinen ermittelt, die mit $150 \mu\text{M NO}_3^-$ angezogen und in der Mitte der Photoperiode geerntet wurden. Von jeweils 9 - 12 Pflanzen (n) wurde der Mittelwert der L-Malatkonzentration berechnet und die Standardabweichung als Fehlerbalken in die Grafik eingetragen.

nicht statistisch zu sichern.

Nach 6 h auf dem K^+ -freien Medium ist die L-Malatkonzentration in den Blättern um 12,7 % auf 5,88 $\mu\text{Mol/g FM}$ gesunken, während im gleichen Zeitraum die L-Malatkonzentration im Rest des Sprosses nur um 8,4 % zurückgeht. Die Abnahme der Malatkonzentration zu diesem Zeitpunkt ist jedoch noch nicht statistisch signifikant.

Einen Tag nach dem Umsetzen auf das Mangelmedium ist die L-Malatkonzentration in den Blättern der Lupine auf 76,6 % des Wertes der Kontrollpflanzen gefallen. Jetzt ist ein schwach signifikanter Unterschied (5% Niveau des t-Tests) gegenüber den Werten der Kontrolle festzustellen. Die L-Malatkonzentration in den restlichen Teilen des Sprosses ist 24 h nach dem Umsetzen auf K-Mangel ebenfalls weiter gesunken. Mit 85,8 % des L-Malatgehaltes der Kontrolle ist jedoch kein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Im Gegensatz zum Spross ist bei der L-Malatkonzentration der Wurzel kein starker Rückgang zu verzeichnen. Dem anfänglichen Anstieg der Menge von L-Malat in der Wurzel 2 h nach Umstellen auf das Mangelmedium, der allerdings im Bereich der Messungenauigkeit liegt, folgt ein Rückgang der L-Malatkonzentration. Der Rückgang in der Wurzel ist schwächer und nicht so gleichmäßig wie in den anderen Pflanzenteilen. Insgesamt kann aber in der Wurzel ein Trend zur Abnahme der Malatkonzentration festgestellt werden.

Nach 2 d auf K^+ -freien Medium gehen die L-Malatgehalte im Spross der Lupine weiter zurück. Mit nur noch 57,9 % der L-Malatkonzentration der Kontrolle ist in den Blättern die Abnahme jetzt statistisch signifikant (1 % Niveau des t-Tests). Auch im Rest des Sprosses lässt sich deutlich weniger L-Malat nachweisen als in der Kontrolle (78,1 %). Der Unterschied ist jedoch noch zu gering, um statistisch abgesichert werden zu können.

5 Diskussion

In Pflanzen ist die N-Aufnahme über die Wurzel ein komplexer Prozess, der in hohem Maße durch die Pflanze reguliert wird (**Haynes**, 1986^a und Abbildung 38, S.119). Bei Versuchen im hydroponischen System kommt dabei der Wahl der N-Form eine bedeutende Rolle zu. Werden Pflanzen ausschließlich mit NO_3^- oder ausschließlich mit NH_4^+ angezogen so zeigt sich, dass bei NH_4^+ -Ernährung ein deutlich niedrigeres Wurzel/Spross-Verhältnis auftritt als bei Angebot von NO_3^- (Tabelle 7, S.43). Auch wenn unter Anzucht mit 100 μM NH_4^+ oder 100 μM NO_3^- keine sehr hohe N-Versorgung vorliegt, so besteht für die NH_4^+ -Pflanzen offensichtlich nicht die Notwendigkeit, mehr Energie in die Ausbildung eines größeren Wurzelsystems zur Nährstoffaufnahme zu stecken. In den NH_4^+ -Varianten konnten die Pflanzen nämlich davon profitieren, dass sie die N-Form nicht erst unter Energieverbrauch reduzieren, sondern direkt zur Synthese von Aminosäuren nutzen konnten. Bei den NH_4^+ -Pflanzen kann die so eingesparte Energie in das Wachstum des Sprosses gesteckt werden. Wie effektiv Pflanzen den energetischen Vorteil einer NH_4^+ -Aufnahme nutzen, zeigen Versuche an Gerste (**Lee und Drew** 1989), in denen NO_3^- ernährte Pflanzen bei Zugabe von NH_4^+ ins Nährmedium mit einer sehr schnellen Reduktion bis hin zur Einstellung der NO_3^- -Aufnahme reagierten.

Im Gegensatz zu Versuchen in Nährlösungen ist im Boden eine reine NH_4^+ -Ernährung allerdings kaum zu erreichen, da NH_4^+ über die Nitrifikanten zügig zu NO_3^- umgewandelt wird (**Haynes**, 1986^b). In der Landwirtschaft und im Gemüsebau macht man sich jedoch die Vorteile einer zumindest partiellen NH_4^+ -Ernährung der Pflanzen zu Nutze, indem man mit Nitrifikationshemmstoffen versucht, die Umwandlung von NH_4^+ zu NO_3^- im Boden zu verzögern (**Zerulla et al**, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf NO_3^- als N-Form gesetzt. Bei Aufnahme, Transport und Reduktion von NO_3^- scheint, unter anderem, K^+ eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde in der Literatur die Funktion eines potentiellen K^+ -shuttles (Abbildung 1, S.10) wiederholt diskutiert worden (**Armstrong und Kirkby** 1979, **Ben Zioni et al.** 1971, **Kirkby et al**, 1981, **van Beusichem et al** 1985).

Mit verschiedenen Methoden wurde hier deshalb der Frage nachgegangen, welche Rolle K^+ beim N-Stoffwechsel von Pflanzen bei Anzucht mit NO_3^- zukommt. Dabei

wurde zwischen Spezies unterschieden, bei denen die Reduktion von NO_3^- überwiegend im Spross (*Brassica napus* L.) oder in der Wurzel (*Lupinus albus* L.) stattfindet.

5.1 K^+ -Angebot und Wurzel / Spross - Verhältnis

Die Auswertung der Wachstumsraten von *Brassica napus* L. (Tabelle 7, S.43) zeigt, dass bereits eine Konzentration vom $30 \mu\text{M K}^+$ im Nährmedium ausreicht, um den Effekt des K^+ -Mangels stark abzuschwächen. In den -K-Varianten ist das Wurzel/Spross-Verhältnis zu Gunsten einer größeren Wurzelmasse verschoben. Dieser Trend verstärkt sich mit zunehmendem Alter der Pflanzen weiter, was darauf hindeutet, dass die Pflanzen versuchen, durch die Ausbildung einer größeren Wurzelmasse eine höhere Aufnahmefläche für die im Mangel befindlichen Nährstoffe zu schaffen.

Bei *Lupinus albus* L. führt ein K-Mangel (Tabelle 8, S.46) zu denselben Auswirkungen wie bei der zuvor beschriebenen Raps-Spezies.

Obwohl Raps und Lupine unterschiedliche Präferenzen im Hauptort der Nitratreduktion haben, sind bei den verschiedenen Varianten der K^+ -Versorgung vergleichbare Effekte im Spross- oder Wurzelwachstum nachweisbar.

5.2 Kaliumaufnahme

Bei *Brassica napus* L. hat die Wahl der N-Form einen Einfluss auf die Kaliumaufnahme, der stärker ausfällt als die Auswirkungen eines temporären K^+ -Mangels oder einer kontinuierlichen sehr geringen K^+ -Versorgung. Es konnte gezeigt werden (Tabelle 24, S.84), dass bei Anzucht mit NO_3^- die K^+ -Aufnahme in -K-Varianten (14 d Mangel) mit $0,76 \mu\text{M K}^+ / \text{g FM h}^{-1}$ nur bei 90% der Aufnahmerate von kontinuierlich mit K^+ ernährten Pflanzen liegt. Auch wenn sich diese Abweichung nicht statistisch absichern ließ, so liegt die Aufnahmerate doch höher als bei NH_4^+ -ernährten Rapspflanzen, die trotz ausreichendem K^+ -Angebot nur auf 82% der Aufnahmerate von Pflanzen auf Medium mit NO_3^- kamen. Diese Abweichung der K^+ -Aufnahme zwischen NH_4^+ - und NO_3^- -ernährten Pflanzen ist signifikant (5%-Niveau, t-Test).

Von einer reduzierten K^+ -Aufnahme in Gegenwart von NH_4^+ ist auch bei anderen Spezies berichtet worden. Die Meinung geht dabei auseinander, ob die K^+ -Aufnahme direkt über die K^+ -Konzentration in der Wurzel gesteuert wird (**Siddiqi** und **Glass**, 1987), oder ob ein vom Spross signalisierter K^+ -Bedarf (**Engels** et al, 1992) die

treibende Kraft darstellt. Ein Zusammenhang zwischen K^+ - und NO_3^- -Aufnahme und K^+ - und NO_3^- -Transport wird dabei aber von allen Autoren gesehen.

Werden NO_3^- -ernährte Rapspflanzen auf ein Medium mit K^+ umgestellt, so setzt die Abgabe von OH^- bzw. HCO_3^- an das Nährmedium ohne zeitliche Verzögerung aus, steigt nach einigen Stunden wieder an und erreicht nach 2 d das Niveau der kontinuierlich mit K^+ versorgten Pflanzen (Abbildung 25, S.85). Dabei ist anfangs noch kein Efflux von K^+ aus den Wurzeln der Rapspflanzen nachweisbar. Dieser setzt jedoch ca. 1 h nach Umstellung auf das Vollmedium langsam ein (Abbildung 26 C, S.87). Nach Aufhebung der K^+ -Mangelsituation beginnt die Pflanze mit der Aufnahme von K^+ , wobei der Aufnahmemechanismus offenbar keiner speziellen Induktion bedarf, da die Aufnahme sofort nach Kontakt mit K^+ auf einem Niveau startet, welches nahe dem von ausreichend K^+ -ernährten Pflanzen liegt.

Das anfängliche Fehlen eines Efflux von K^+ lässt vermuten, dass die im Cytoplasma vorhandene Menge an freiem K^+ sehr gering ist. Der Vergleich der K^+ -Menge in den Wurzeln von -K (322 $\mu M K^+$ / g TM) und +K Variante (1342 $\mu M K^+$ / g TM, Tabelle 22, S.82) zeigt zwar, dass die Mangelpflanzen ein deutliches Defizit an K^+ aufweisen.

Mit der einsetzenden Aufnahme von K^+ muss die Wurzel zum Ladungsausgleich die Abgabe von H^+ in das Außenmedium vornehmen. Da die Wurzel unter K^+ -Mangel jedoch keinen H^+ -Export zur Aufnahme von K^+ vornehmen muss, kommt es jetzt zu einer Überlagerung von Effekten aus K^+ -Aufnahme und NO_3^- -Aufnahme. Während die NO_3^- -Aufnahme, unabhängig davon ob man von einem Symport von H^+/NO_3^- oder einem Antiport von HCO_3^-/NO_3^- ausgeht (Abbildung 37, S.117), zu einer Alkalisierung des Außenmediums führt, ist die Aufnahme von K^+ mit einer Abgabe von H^+ kombiniert. Bei Überlagerung dieser beiden Prozesse kann die Netto-Abgabe von HCO_3^- daher zurückgehen. Weil die K^+ -Aufnahme mit einer niedrigeren Rate erfolgt als die NO_3^- -Aufnahme, kann dieser Effekt allerdings nicht lange anhalten.

Mit dem Auffüllen des K^+ -Pools der Pflanze und dem Einsetzen eines K^+ -Efflux ist bei *Brassica napus* L., etwa 2 d nach Aufhebung des K-Mangels, die für kontinuierlich mit K^+ und NO_3^- -ernährte Pflanze übliche Abgabe von OH^- bzw. HCO_3^- wieder erreicht.

Die Beobachtung, dass nach der Aufhebung des K^+ -Mangels neben der Aufnahme von K^+ auch die Aufnahme von NO_3^- deutlich ansteigt, spricht für einen Zusammenhang zwischen den beiden Aufnahmesystemen.

5.3 Stickstoff-Aufnahme

Bevor Nährstoffe der Pflanze für ihren Stoffwechsel zur Verfügung stehen, müssen sie aus dem umgebenden Medium aufgenommen werden. Um in die Pflanze zu gelangen, muss letztendlich die Plasmamembran überwunden werden (**Haynes**, 1986^a). Zwar können Ionen über den apoplastischen Transport im Interzellularraum des Rindengewebes der Wurzel bis zur Endodermis gelangen, jedoch blockiert dort der Casparysche Streifen einen weiteren Transport außerhalb der Zellen. Spätestens jetzt muss die Aufnahme in die Zellen erfolgen, bevor dann der symplastische Transport die Nährstoffe weiter transportieren kann (Abbildung 37, S.117).

Für die Aufnahme von Nitrat in die Zelle sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden, die schon in der Literaturübersicht (S.12-16) vorgestellt wurden. Als treibende Kraft für die Aufnahme von Nitrat wird der von den H⁺ATPasen generierte elektrochemische Gradient an der Plasmamembran angeführt (**Thibaud** und **Grignon**, 1981; **Meharg** und **Blatt**, 1995). Molekularbiologische Studien deuten zudem darauf hin, dass ein Angebot von NO₃⁻ nicht nur zur Expression von Transportproteinen zur NO₃⁻Aufnahme, sondern auch zur Aktivierung von Genen zur Synthese von plasmalemma-gebundenen H⁺ATPasen führt (**Santi** et al, 2003). NO₃⁻ bewirkt damit, allein durch seine Gegenwart im Außenmedium, dass der elektrochemische Gradient am Plasmalemma aufgebaut wird, welcher später die Aufnahme von NO₃⁻ in die Zelle ermöglicht. In zahlreichen pflanzenphysiologischen Studien kristallisierte sich heraus, dass mindestens 3 verschiedene Aufnahmesysteme für NO₃⁻ existieren (**Forde** und **Clarkson**, 1999).

Bei hohem externem Angebot wird NO₃⁻ über das **LATS** (*Low Affinity Transport System*) in die Pflanzen aufgenommen. Das LATS ist konstitutiv exprimiert und es sind keine Faktoren bekannt, die Einfluss auf die Regulation des LATS haben. Von **Crawford** und **Glass** (1998) wurde beschrieben, dass das LATS ab einem Angebot von über 250 µM NO₃⁻ an Bedeutung gewinnt und erst bei einem Angebot von 50 mM NO₃⁻ in Sättigung geht.

Im hier untersuchten Raps und in Lupinen scheint das LATS allerdings erst bei geringfügig höherem Angebot (zwischen 0,5 und 1 mM) eine Rolle bei der N-Aufnahme zu spielen (*Brassica napus* L.: S.68 ff, *Lupinus albus* L.: S.73 ff). Bei einem NO₃⁻-

Angebot zwischen 1 mM und 25 mM ist das LATS durch eine lineare Beziehung von N-Angebot und N-Aufnahme gekennzeichnet (*Brassica napus* L.: Abbildung 16 S.69, *Lupinus albus* L.: Abbildung 18 S.74). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Untersuchungen an Gerste (Siddiqi et al, 1990), wo ebenfalls bei hohem NO_3^- -Angebot eine lineare Beziehung zwischen Angebot und Aufnahme von NO_3^- festgestellt wurde. Weil das LATS durch äußere Faktoren kaum zu beeinflussen ist, bietet es allerdings nicht den optimalen Ansatz zum Bestimmen des Einflusses anderen Ionen auf die N-Aufnahme.

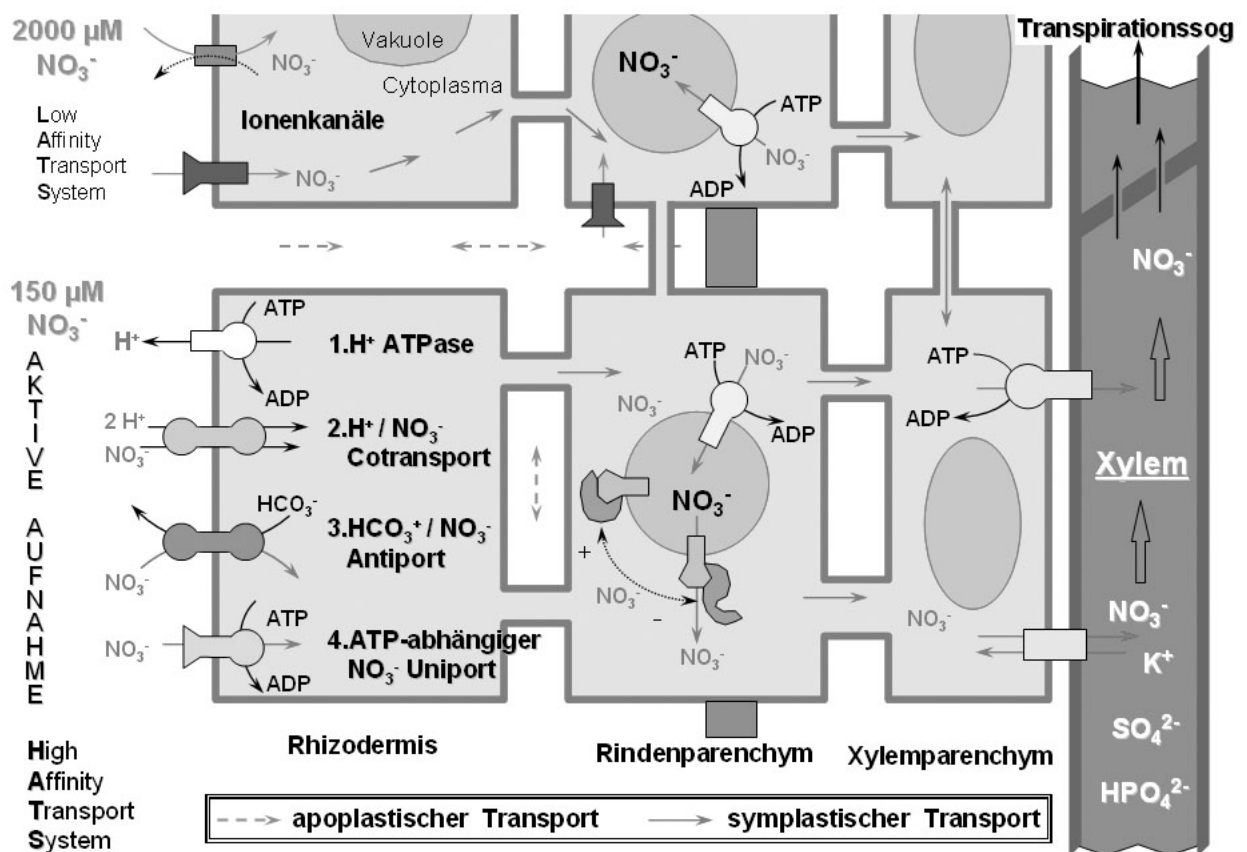


Abbildung 37: Schematische Darstellung zur Aufnahme und Transport von NO_3^- in der Wurzel. Über den apoplastischen Transport kann NO_3^- im Interzellularraum bis zum Casparyschen Streifen gelangen. Danach muss die Aufnahme in die Zellen der Pflanze erfolgen, bevor eine Weiterleitung in andere Teile der Pflanze möglich wird (symplastischer Transport).

Bei hohem N-Angebot (oben) erfolgt die Aufnahme von NO_3^- nach dem *Low Affinity Transport System* (LATS), während bei niedrigem N-Angebot (unten) das Energie verbrauchende *High Affinity Transport System* (HATS) die N-Versorgung der Pflanze sicherstellt.

Als weiteres Aufnahmesystem für NO_3^- ist bereits auf das **HATS** (*High Affinity Transport System*) verwiesen worden (S.14-16), welches bei einem NO_3^- -Angebot von bis zu 0,5 mM aktiv ist. Beim HATS unterscheidet man zwei deutlich verschiedene Formen.

Das **cHATS** (*constitutive High Affinity Transport System*) ist durch eine sehr hohe Affinität zu NO_3^- und eine geringe Aufnahmekapazität geprägt, was sich in sehr niedrigen K_M -Werten bemerkbar macht. Diese liegen, je nach Spezies, zwischen 6 und 20 μM (**Crawford** und **Glass**, 1998). In den hier durchgeführten Versuchen lässt sich die Kinetik des cHATS von *Brassica napus* L. (Abbildung 14, S.63) und *Lupinus albus* L. (Abbildung 17, S.73) als Kurve des NO_3^- -Influx von NH_4^+ -ernährten Pflanzen erkennen. Bei der Lupine hat das cHATS dabei mit $0,4 \mu\text{M/g FM h}^{-1}$ eine viel geringere Aufnahmekapazität als bei Raps ($7,5 \mu\text{M/g FM h}^{-1}$). Der K_M -Wert des cHATS von *Lupinus albus* L. liegt mit 12 μM in dem in der Literatur zitierten Bereich (**Crawford** und **Glass**, 1998). Bei *Brassica napus* L. hingegen ist die Affinität des cHATS mit einem K_M -Wert von ca. 35 μM wesentlich schwächer als für andere Pflanzen beschrieben. Dies wird jedoch durch die extrem hohe Aufnahmekapazität des cHATS von Raps wettgemacht, welche sogar die Aufnahmekapazität des iHATS der meisten anderen untersuchten Pflanzenspezies übersteigt.

Auch das cHATS bietet nicht den optimalen Ansatz zum Studium des Einflusses verschiedener Parameter auf die NO_3^- -Aufnahme, da dieses Aufnahmesystem immer aktiv ist und ein sehr geringes NO_3^- -Angebot voraussetzt, was bei einer kontinuierlichen N-Versorgung der Pflanzen während der Anzucht problematisch werden kann. Darüber hinaus entspricht ein N-Angebot von unter 20 μM nicht den typischen Bedingungen der Pflanze im Boden.

Mit dem **iHATS** (*inducible High Affinity Transport System*) ist das dritte Aufnahmesystem für NO_3^- gerade angesprochen worden. Das iHATS zeigt zwar je nach Spezies mit einer K_M von 20-100 μM (**Crawford** und **Glass**, 1998) eine etwas geringere Affinität zu NO_3^- als das cHATS, hat dafür aber eine wesentlich höhere Aufnahmekapazität (**Siddiqi** et al, 1990). Als induzierbares System ist es darüber hinaus gut geeignet, um Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Faktoren auf die NO_3^- -Aufnahme anzustellen. Daher wurden die meisten der hier beschriebenen

Versuche bei einem NO_3^- -Angebot durchgeführt, das zwischen 100 μM und 250 μM NO_3^- lag.

Im Rahmen der Induktion des iHATS (Abbildung 19 bis Abbildung 22, S.76) steigt, nach vorausgegangenem NH_4^+ -Angebot, die NO_3^- -Aufnahme innerhalb kurzer Zeit deutlich an. Dies ist auf eine starke Zunahme des Influx zurückzuführen, während ein Efflux erst langsam einsetzt. Für Raps, Gerste und Lupine konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten für die genannten Spezies gleich ist (Abbildung 23a-c, S.78 und Abbildung 24a-c, S.79). Abhängig davon, welche Aufnahmekapazität das cHATS der untersuchten Pflanze aufweist, ist ein Anstieg der NO_3^- -Aufnahme um den Faktor 4-5 (Raps und Gerste) oder bis 22 (Lupine) zu verzeichnen. Mit Fortschreiten der NO_3^- -Ernährung geht der Influx wieder etwas zurück (Abbildung 21, S.76), wobei der Efflux noch weiter ansteigt.

Dieser Verlauf kann damit erklärt werden, dass anfangs NO_3^- durch die

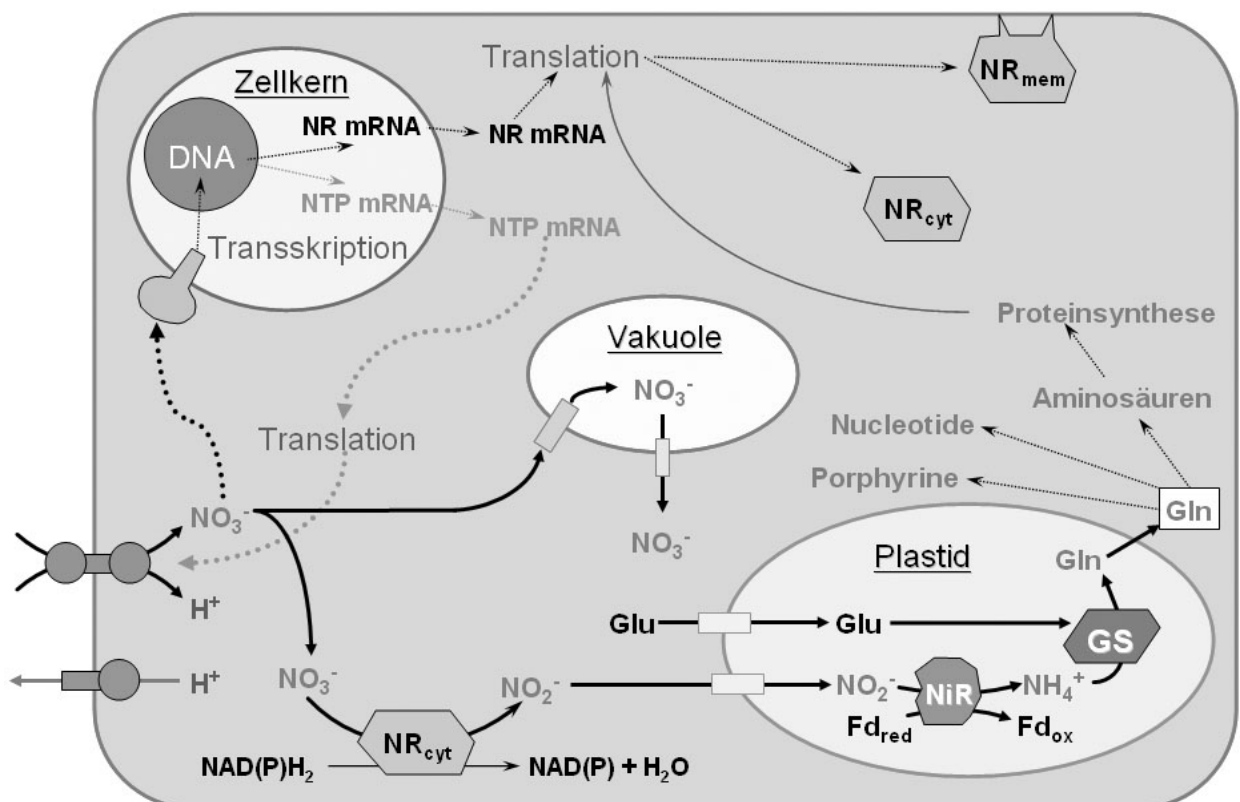


Abbildung 38: Schema zur Regulierung des N-Stoffwechsels in der Zelle. Modifiziert nach **Crawford** (1995) und **Richter** (1988). NR=Nitratreduktase, NTP=Nitrattransportprotein, NiR=Nitritreduktase, Fd=Ferredoxin, GS=Glutaminsynthetase.

Transportproteine des cHATS in die Zelle aufgenommen wurde (nicht induziert). Mit der Präsenz von NO_3^- im Außenmedium kommt es zu einem Anstieg von NO_3^- im Cytoplasma, was zu einer Aktivierung von Genen für Proteine des iHATS führt. Es kommt zu einem Anstieg der mRNA für Proteine des iHATS und zur Synthese von Transportproteinen des iHATS. Diese Transportproteine erlauben dann die stärkere Aufnahme von NO_3^- (Abbildung 38, S.119). Dabei reicht bereits ein kurzer NO_3^- Puls aus (Abbildung 15, S.67) um die Synthese der Carrier-Proteine anzustoßen. Wird nach solch einem Puls allerdings für 1 d der Pflanze das N-Angebot entzogen, so geht die Aufnahmerate wieder zurück, da die NO_3^- -Konzentration im Cytoplasma stark absinkt und so die Signalkette zur Proteinsynthese zum Erliegen kommt.

Steigt bei fortgesetztem NO_3^- -Angebots im Außenmedium die Konzentration im Cytoplasma jedoch weiter an, so kommt es zu einer negativen feedback-Regulation, die letztendlich zu einer Reduktion der Bildungsrate von iHATS-Transportproteinen führt. Die Wurzelzelle verfügt zu diesem Zeitpunkt jedoch schon über genügend Transporter, so dass sie auf hohem Niveau weiter Nitrat aufnehmen kann.

Auch nach der Aufhebung eines temporären K^+ -Mangels scheint derselbe Mechanismus wie bei der Induktion der Nitrataufnahme nach vorausgegangener NH_4^+ -Ernährung abzulaufen. Nach 10 d auf Medium ohne K^+ zeigt *Brassica napus* L. eine geringere NO_3^- -Aufnahme als Pflanzen auf Vollmedium. Sobald den Pflanzen jedoch K^+ im Nährmedium angeboten wird, steigt die NO_3^- -Aufnahme deutlich an. Dies ist auf eine Zunahme des NO_3^- -Influx zurückzuführen, während der NO_3^- -Efflux nur geringfügig ansteigt (Tabelle 21, S.76). Bereits 4 h nach Kontakt mit K^+ hat der NO_3^- -Influx das Niveau von kontinuierlich mit K^+ ernährten Pflanzen (Abbildung 22, S.76) erreicht und zeigt somit ein identisches Bild wie nach NH_4^+ -Ernährung.

Nach 2 d auf Medium mit K^+ zeigen die Pflanzen gegenüber der +K-Variante noch eine erhöhte N-Aufnahme, welche größtenteils aus einem gesteigerten Influx stammt. Aber auch der Efflux ist noch auf niedrigerem Niveau als bei den kontinuierlich K^+ -ernährten Pflanzen. Während sich bei der Induktion der NO_3^- -Aufnahme von anfänglich NH_4^+ -ernährten Pflanzen das für die jeweilige Spezies spezifische Verhältnis von NO_3^- -Influx und NO_3^- -Efflux nach 1 d einstellt, benötigen die Pflanzen für die Adaptation nach K^+ -Mangel mehr Zeit. Dies lässt sich aufgrund der stark erniedrigten K^+ -Gehalte in Blättern und Wurzeln der -K-Variante (Tabelle 22, S.82) von *Brassica napus* L. erklären. Unter

der Mangel-Situation sind die Gehalte von sowohl K^+ und NO_3^- in den Blättern sehr stark erniedrigt. Auch in der Wurzel sind die Gehalte niedriger als in der +K-Variante, jedoch ist hier die Differenz geringer.

Mit der Aufhebung des K^+ - Mangels wird bereits nach 1 d in den Blättern der K^+ -Gehalt erreicht, der auch in der +K-Variante vorliegt. Die NO_3^- -Konzentration in den Blättern ist jedoch erst auf 41% des Wertes der +K-Pflanzen angestiegen. Auch wenn der „normale“ K^+ -Status in den Blättern der Pflanzen wiederhergestellt ist, so ist zum Erreichen der NO_3^- -Konzentration von +K-Pflanzen noch eine längere Periode mit erhöhter Aufnahmeleistung für NO_3^- notwendig.

Von einer Förderung der NO_3^- -Aufnahme durch K^+ berichteten auch **Blevins** et al. (1978), die für Gerste zeigen konnten, dass bei den Pflanzen nach Umstellen auf ein Medium ohne K^+ die NO_3^- -Aufnahme anfangs nicht beeinflusst wird. Nach 4 h machte sich der Mangel jedoch durch einen Rückgang der NO_3^- -Aufnahmerate bemerkbar. Bei fortgesetztem K-Mangel war nach 3 d in den Blättern ein deutlicher Rückgang des NO_3^- -Gehaltes nachweisbar, jetzt deutlich unter dem NO_3^- -Gehalt der Wurzeln lag. Dem gegenüber zeigte die +K-Variante neben wesentlich höheren NO_3^- -Gehalten in Blatt und Wurzel auch die höchste NO_3^- -Konzentration in den Blättern. Sie vermuteten daher, dass die begrenzte Menge an K^+ zu einer verminderten Verlagerung in die Blätter geführt hatte.

Für Weizen konnte gezeigt werden (**Barneix** und **Breteler**, 1985), dass KNO_3 -ernährte Pflanzen eine höhere NO_3^- -Aufnahme im Vergleich zu $NaNO_3$ - oder $Ca(NO_3)_2$ -ernährten Pflanzen aufweisen. In den Untersuchungen wurde darüber hinaus festgestellt, dass ab einem Angebot von 0,25 mM K^+ die NO_3^- -Aufnahme nicht weiter gesteigert werden konnte, während die K^+ -Aufnahme jedoch weiter zunahm. Die Menge des von -K-Pflanzen gesammelten Xylemsafts fiel geringer aus als bei der +K-Variante.

Die Analyse des Xylemsaftes von dekapitierten Rapspflanzen (Tabelle 25, S.89) zeigt, dass 4 h nach Wiederaufnahme der Versorgung mit K^+ die Exudatmenge von 98 auf $120 \mu l / g FM_{Wurzel} h^{-1}$ ansteigt, was mit der gleichzeitig angestiegenen Ionenkonzentration eine höhere Transportrate im Xylem mit sich bringt. Zu diesem Zeitpunkt liegt der K^+ -Transport im Xylem-Exudat mit $0,263 \mu M / g FM_{Wurzel} h^{-1}$ (Tabelle 26, S.92) bei mehr als dem 11-fachen der -K-Variante. Die im Xylem transportierte Menge von anderen Ionen hat dabei ebenfalls zugenommen (8 - 9% für

HPO_4^- , SO_4^{2-} und Mg^{2+} ; 4% für Ca^{2+} und 29% für NO_3^-) während der Na^+ -Transport um 68% zurückging.

Der Vergleich von Pflanzen im *steady state* zeigt, dass im Xylemexudat der -K-Variante die Transportrate von Anionen gegenüber der +K-Variante verringert ist (HPO_4^- = -44%, SO_4^{2-} = -12%, NO_3^- = -25%), während bei den Kationen eine deutlich höhere Transportrate festzustellen ist (Mg^{2+} = +28%, Ca^{2+} = +46%, Na^+ = +2517%). Ein geringer Transport von K^+ ist im Exudat zwar ebenfalls noch nachzuweisen, er liegt aber nur bei ca. 6% der Transportrate in der +K-Variante.

Unter K^+ -Mangel verschiebt sich bei *Brassica napus* L. zudem das Anionen / Kationen - Verhältnis im Exudat zu Gunsten der Kationen. Vergleichbares wurde auch für andere Spezies berichtet (**Barneix** und **Breteler**, 1985). Arbeiten zu Untersuchungen des Salz-Stresses an Gerste berichten in diesem Zusammenhang auch von der Funktion des Sprosses bei der Separierung des Flusses von K^+ und Na^+ in die Blätter (**Wolff** et al., 1991).

Der unter K^+ -Mangel stark erhöhte Gehalt von Na^+ im Xylemexudat von *Brassica napus* L. deutet darauf hin, dass Na^+ zumindest in gewissem Umfang in der Lage ist, K^+ als Begleit-Ion von NO_3^- beim Xylemtransport zu ersetzen. Allerdings ließ sich auch bei andauerndem K^+ -Mangel noch K^+ im Xylemexudat nachweisen (Tabelle 26, S.92), obwohl die Aufnahme von K^+ über die Wurzel unter diesen Anzuchtbedingungen ausgeschlossen werden kann. Die Gegenwart von K^+ im Xylemexudat lässt sich demnach nur so erklären, dass entweder K^+ in der Wurzel mobilisiert und dem Spross zur Verfügung gestellt wird, oder dass die mehrfach beschriebene Zirkulation (**Dijkshoorn**, 1958; **Ben Zioni** et al., 1971; **Kirkby** et al., 1981) von K^+ zwischen Spross und Wurzel selbst unter K^+ -Mangel stattfindet. Bei *Brassica napus* L. ist nach 14 d unter K^+ -Mangel die Gesamtmenge von K^+ in den Pflanzen auf etwa 20% des Gehaltes in der +K-Variante zurückgegangen (Tabelle 22, S.82 unter Einrechnung der jeweiligen Frischmassen). Die K^+ -Fracht im Xylem liegt allerdings nur noch bei 6,5% der Transportrate in den +K-Pflanzen (Tabelle 26, S.92). Der geringe Xylemstrom hat auch dazu beigetragen, dass in der -K-Variante nur noch 34% des gesamten K^+ im Spross vorliegen, während in der +K-Variante das K^+ jeweils zur Hälfte auf Spross und Wurzel aufgeteilt ist.

Dies alles spricht für eine Mobilisierung von K^+ aus der Wurzel zur Deckung des Bedarfs im Spross, auch wenn sich die Frage stellt warum diese Umverteilung selbst

nach 14 d auf Mangelmedium noch nicht abgeschossen ist. Ohne zusätzliche Daten zum basipetalen Transport von K^+ im Phloem lässt sich allerdings keine gesicherte Aussage machen, ob der akropetale K^+ -Strom im Xylem aus einer K^+ -Rezirkulation stammt, oder hier nur K^+ aus der Wurzel zur Deckung des Bedarfs im Spross umgelagert wird.

Die von *Lupinus albus* L. gewonnene Exudatmenge betrug in allen Varianten zwischen 30 und 40 $\mu\text{l/g FM}_{\text{Wurzel}} \text{ h}^{-1}$ und lag damit nur bei $\frac{1}{3}$ des bei Raps gesammelten Volumens.

Eine Änderung der K-Ernährung hatte bei *Lupinus albus* L. nur eine geringfügige Änderung der Exudatmenge zur Folge (Tabelle 27, S.94). Da *Lupinus albus* L. aufgenommenes NO_3^- vorwiegend in der Wurzel reduziert, konnte bei Anzucht mit 250 μM NO_3^- nur eine Konzentration von NO_3^- im Exudat festgestellt werden, die knapp über der Nachweisgrenze lag. Erst bei deutlich höherem Angebot lässt sich NO_3^- im Exudat sicher bestimmen. Bei hohem N-Angebot ist jedoch schon ein anderes N-Aufnahmesystem aktiv (LATS, Abbildung 37, S.117).

Falls auch bei der Lupine die Aufhebung eines K-Mangel zu einer verstärkten Aufnahme von NO_3^- führt, so wäre ein Anstieg der NO_3^- -Konzentration im Xylemsaft zu erwarten. Die Auswertung der Xylemsaft-Analytik lässt für *Lupinus albus* L. allerdings keinen klaren Trend für den NO_3^- -Transport bei der Umstellung der K-Ernährung von -K nach +K oder für den umgekehrten Fall erkennen. Möglicher Grund hierfür ist, dass die Lupine NO_3^- normalerweise überwiegend in der Wurzel reduziert und daher nicht auf einen Co-Transport von NO_3^- mit einem passenden Kation im Xylem angewiesen ist.

Bei höherem NO_3^- -Angebot, wobei hier allerdings die N-Aufnahme über das LATS erfolgen dürfte, konnte gezeigt werden, dass in *Lupinus albus* L. eine Zirkulation von K^+ stattfindet und bei gleichzeitigem Angebot von Na^+ und K^+ die Einlagerung von K^+ vor allem in die jüngeren Blätter erfolgt (Jeschke et al., 1992).

Werden nur die Pflanzen im *steady state* betrachtet, so lässt sich feststellen, dass die SO_4^{2-} -Konzentration im Exudat in allen Fällen (-K, +K, niedriges und hohes N-Angebot) bei 1,0 μM / ml liegt. Für HPO_4^{2-} ist unter K-Mangel eine erhöhte Konzentration im Exudat nachweisbar. Die Konzentration von NO_3^- im Exudat der -K-Variante ist bei niedrigem N-Angebot (250 μM) geringer, bei hohem N-Angebot (2,5 mM) hingegen höher als in der +K Variante. Die Ursache hierfür ist unklar.

5.4 Nitratreduktaseaktivität und K^+

Die Reduktion von NO_3^- ist ein Prozess, der von der Pflanze über unterschiedliche Wege reguliert werden kann. Eine Regulierung der NRA in der Zelle ist notwendig, damit in Cytoplasma der Gehalt an NO_2^- kein toxisches Niveau erreicht. Aber auch Nebenreaktionen der NR, wie die Bildung von NO (**Rockel et al.**, 2002) müssen von der Pflanze kontrolliert werden.

Der erste Weg zur Regulierung der NRA läuft über Transskription und die Translation der NR (Abbildung 38, S.119). Er wird durch Licht und die Gegenwart von NO_3^- gesteuert (**Li und Oaks**, 1993; **Li und Oaks**, 1994; **Somers** 1983). Dabei hat die NR nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden (**Oaks et al.**, 1972; **Li und Oaks**, 1994), wobei in der Dunkelphase ein Abbau von NR erfolgt.

Der Einfluss des NO_3^- -Angebots auf die NRA von *Brassica napus L.* zeigt, dass mit steigendem Angebot von NO_3^- auch die NRA zunimmt (Abbildung 9, S.50). Dies könnte durch eine höhere spezifische Aktivität der NR oder aber durch eine höhere Konzentration an NR-Proteinen erreicht werden. Gewissheit kann hier zwar nur eine Bestimmung des Gehaltes an NR bringen, allerdings lassen die oben genannten Quellen einen höheren NR-Gehalt als die wahrscheinlichere Ursache erscheinen. Bestärkt wird dies auch durch Untersuchungen zur Induktion der NRA nach vorausgegangener NH_4^+ -Ernährung (Tabelle 11, S.52). So ist 6 h nach der Umstellung auf NO_3^- -Ernährung eine Verdoppelung der NRA in allen Pflanzenteilen festzustellen. Während die Zunahme der NRA in den Wurzeln nach 2 h noch durch das Abspalten von NR-Inhibitoren erklärt werden könnte, lässt sich die Zunahme nach 6 h nur durch eine von NO_3^- bewirkte Neusynthese des Enzyms erklären. Dafür spricht die deutliche Verzögerung, denn erst über die in Abbildung 38 (S.119) dargestellte Signalkette wird die Transkription und anschließende Translation der NR-Gene erreicht.

Die Tatsache, dass *Brassica napus L.* trotz einer NO_3^- -freien Ernährung über eine hohe NRA verfügt, wirft die Frage auf, ob die Nitratreduktase bei Raps möglicherweise konstitutiv exprimiert ist, oder ob in der NH_4^+ -Nährlösung geringe Mengen von Nitrat vorhanden waren, die eine teilweise Induktion der Pflanzen bewirkten. In den untersuchten Nährlösung der NH_4^+ -Variante ließ sich allerdings kein NO_3^- nachweisen.

Für *Brassica napus L.* wurde gezeigt, dass neben Schwankungen der NRA im

Tagesverlauf (Abbildung 11, S.56 und Abbildung 12, S.57) auch die Zusammensetzung des Mediums für den NR-Test eine Rolle spielt. Die Effekte beim Enzymtest traten ohne zeitliche Verzögerung auf, was eine Aktivierung oder Deaktivierung von Genen ausschließt, da ein solcher Prozess sich über einige Stunden (siehe Induktion der Nitrataufnahme, S.75 - S.79) erstreckt. Da K^+ im Reaktionsmedium von -K-Varianten zu einer Steigerung der Aktivität führt, Na^+ in den +K-Varianten jedoch zu einem geringeren Messwert, scheint bei den beiden Kationen ein Antagonismus vorzuliegen.

Als Modell zur Regulierung der NRA hat sich das von **Kaiser** und **Huber** (1994^a und 1994^b) vorgestellte Modell zu einer posttranslationalen Modifikation der NR durchgesetzt (Abbildung 39, S.125). Die Inaktivierung der NR erfolgt durch eine Phosphorylierung von Serin-Gruppen an der NR, wobei Mg^{2+} oder Phosphatester eine Inaktivierung der NR fördern, freies Phosphat oder 5'AMP aber zu einer Aktivierung beitragen (**Kaiser** und **Huber**, 1994^a; 1994^b; **Spill** und **Kaiser**, 1994).

In den hier beschriebenen Versuchen fällt die Hemmung der NRA von +K-Pflanzen durch Einsatz von Na^+ im Enzymtest in den Wurzeln von *Lupinus albus* L. (-22%) und

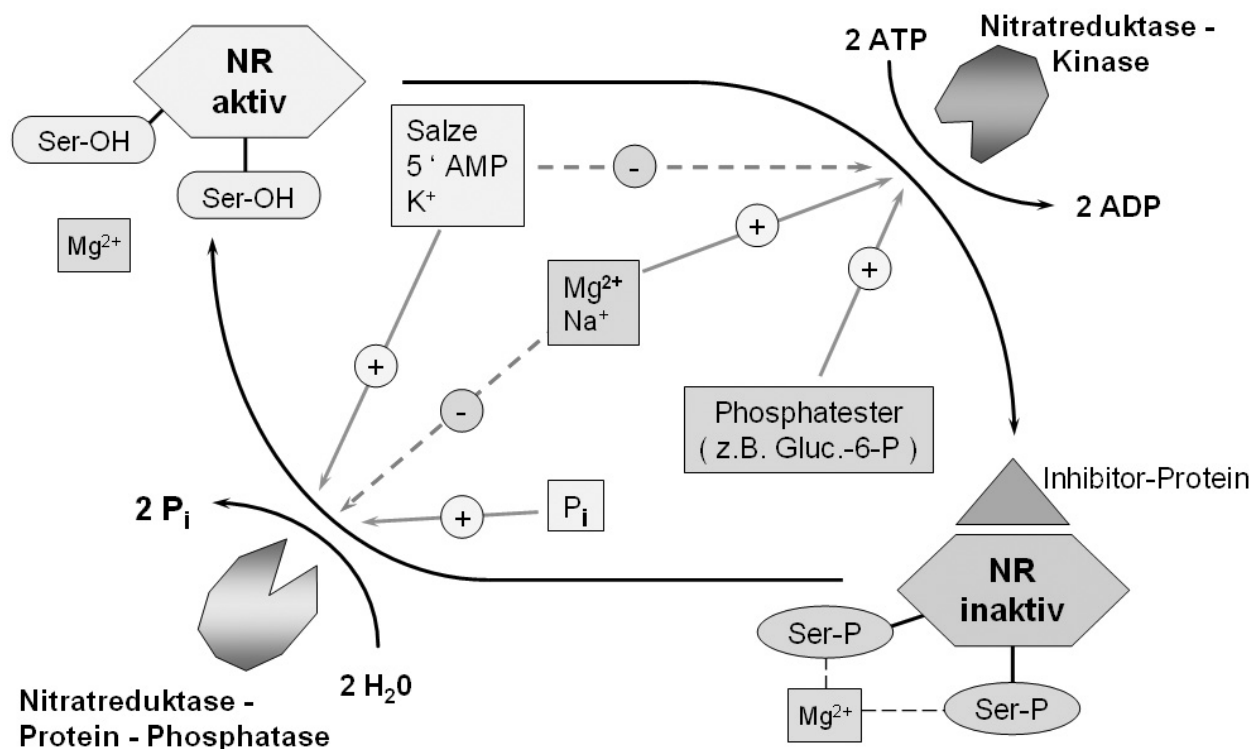


Abbildung 39: Modell zur Regulation der NRA in höheren Pflanzen. Modifiziert nach **Kaiser** und **Huber** (1994^a und 1994^b), **Spill** und **Kaiser** (1994). In die Darstellung sind zusätzlich die Auswirkungen von K^+ oder Na^+ aufgenommen worden.

Brassica napus L. (-45%) sehr deutlich aus. Im Spross oder in den Blättern der beiden Spezies zeigt Na^+ hingegen mit einer Hemmung von ca. 5% nur einen schwachen Effekt.

Der positive Effekt von K^+ auf die NR von Raps und Lupine fällt im Enzymtest weniger stark ins Gewicht als die Hemmung durch Na^+ . In den Wurzeln von Raps und Lupine ist eine Zunahme von ca. 5% zu verzeichnen. In den Blättern von *Lupinus albus* L. zeigte K^+ keinen Effekt, was aber mit der insgesamt kaum nachweisbaren NRA in dieser Fraktion zusammenhängen könnte. Dafür ließ sich im Spross eine Zunahme der NRA feststellen, welche analog zur Zunahme in der Wurzel ist. Bei *Brassica napus* L. steigert K^+ im Enzymtest die NRA in den Blättern um 24%.

Während eine schnelle Hemmung der NRA in Raps und Lupine durch Na^+ sich vor allem in den Wurzeln bemerkbar macht, zeigt sich eine Steigerung durch K^+ verstärkt in den Rapsblättern bzw. in geringerem Umfang im Spross der Lupine. Es ist daher möglich, dass in Spross und Wurzel der beiden untersuchten Spezies unterschiedliche NR-Proteine aktiv sind, die sich im Hinblick auf ihre Na^+ -Empfindlichkeit unterscheiden. Das schnelle Eintreten des fördernden Effekts von K^+ und des hemmenden Effekts von Na^+ im Medium des Enzymtests auf die NRA sprechen dafür, dass durch K^+ die NR-Phosphatase aktiviert wird, während Na^+ die Reaktion der NR-Kinase fördert (Abbildung 39, S.125).

Nach dem kurzfristig eintretenden Effekt von K^+ und Na^+ auf die NRA soll auch auf den Einfluss einer kontinuierlich Ernährung mit K^+ bzw. Na^+ eingegangen werden. Da diese Tests alle mit K^+ im Testmedium durchgeführt wurden, kann ein Effekt, der aus dem Medium des Enzymtests stammte, vernachlässigt werden, auch wenn für die -K-Varianten die NRA möglicherweise etwas zu hoch ausgewiesen wird.

Der stärkste Effekt ließ sich bei Raps und Lupine in den Wurzeln feststellen. In der -K-Variante ist die NRA bei Raps (-75%) und bei Lupinen (-40%) deutlich unter derjenigen der +K-Variante. Im Spross wirkt sich der Mangel weniger stark auf die NRA aus (Raps -40%, Lupine - 20% der +K-Variante). In den Blättern der Lupinen ist, wegen der ohnehin niedrigen NRA, kein Effekt nachweisbar, während bei Raps die NRA um ca. 50% reduziert ist.

Die Reduktion der NRA unter K^+ -Mangel fällt insgesamt bei Raps doppelt so stark aus wie bei den untersuchten Lupinen. Berücksichtigt man, dass Raps NO_3^- überwiegend in

den Blättern, die Lupine aber überwiegend in den Wurzeln reduziert, so ist die NRA der gesamten Pflanze in den -K Varianten von Raps um ca. 55%, in Lupinen nur um ca. 30% reduziert.

In beiden Spezies ist unter K^+ -Mangel die NRA stärker reduziert, als es eine Inaktivierung der NR durch Phosphorylierung (Abbildung 39, S.125) erklären könnte. Da es für die Pflanze nicht von Nutzen sein kann, größere Mengen von inaktivierter NR aufrecht zu erhalten, liegt der Schluss nahe, dass die Pflanzen unter K^+ -Mangel auch die Konzentration an NR durch Drosselung der NR-Syntheserate absenken. Dies kann letztendlich aber nur durch molekularbiologische Studien belegt werden.

5.5 Verlagerung von Assimilaten und Malat-Analytik

Nach dem Modell von **Ben Zioni** et al. (1971) sollte bei steigender NO_3^- -Aufnahme auch ein verstärkter Transport von Assimilaten in die Wurzel erfolgen (Abbildung 1, S.10). Das über das Phloem gelieferte Malat wird nach dem Modell in der Wurzel unter Mitwirkung des Malatenzyms (MDH) decarboxyliert und in Pyruvat umgewandelt. Das bei der Umwandlung freigesetzte CO_2 ist im Cytosol als HCO_3^- gelöst und kann im Antiport gegen NO_3^- aus dem Nährmedium ausgetauscht werden.

Bei einem $^{14}CO_2$ Pulsexperiment, wie für *Brassica napus* L. in Tabelle 28 (S.96) beschrieben, hätte man demnach erwartet, dass Pflanzen bei hohem N-Angebot ($2,5\text{ mM } NO_3^-$) nicht nur eine höhere Verlagerung von ^{14}C aus den Blättern in die Wurzel, sondern auch eine höhere Abgabe von ^{14}C an das Nährmedium zeigen als eine $0,25\text{ mM } NO_3^-$ -Variante. Stattdessen zeigte sich aber, dass bei hohem N-Angebot der in den Blättern verbliebene Anteil von ^{14}C 2 d nach der Applikation höher ist als bei niedrigem Angebot. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass die Pflanzen bei hohem Angebot NO_3^- über das LATS aufnehmen können, während bei niedrigem Angebot das HATS aktiv ist, welches einen höheren Energiebedarf zur Aufnahme von NO_3^- benötigt. Die Pflanzen unter niedrigem N-Angebot könnten das Malat somit eher zur Energiegewinnung decarboxylieren, während bei höherem Angebot neben der Energiegewinnung auch der Ladungsausgleich in der Wurzel an Bedeutung gewinnt. Da andere Studien zum Ben Zioni-Modell meist mit einem NO_3^- -Angebot von über 1 mM arbeiteten, ist bislang nichts Vergleichbares für das HATS beschrieben.

Auch bei der Abgabe von ^{14}C über die Wurzel stimmen die Beobachtungen nicht mit dem Modell von Ben Zioni überein. In der -K-Variante, welche im Xylem gegenüber der

+K-Variante einen um 94% reduzierten K^+ -Transport aufweist (Tabelle 26, S.92), kann die postulierte Zirkulation von K^+ nur eine untergeordnete Rolle spielen. Möglicherweise kann Na^+ bei K^+ -Mangel die shuttle-Funktion übernehmen. Abgesehen davon zeigt die -K-Variante aber eine Abgabe von ^{14}C an die Nährlösung, welche um mehr als 40% über der Abgabe der +K-Varianten liegt. Die Abgabe von ^{14}C kann hier nicht mit der NO_3^- -Aufnahme korreliert sein, denn diese lag unter den +K-Varianten.

Das unerwartete Verhalten der -K-Variante könnte jedoch auch mit Nebeneffekten aus der Mangelsituation zusammenhängen. So zeigte die -K-Variante eine deutlich niedrigere Abgabe von ^{14}C über die Blätter, was für eine effizientere Nutzung des aufgenommenen CO_2 spricht. Die stärkere Verlagerung von Assimilaten in die Wurzel könnte auch darin begründet sein, dass die Pflanze mehr Energie in das Wachstum des Wurzelsystems steckt, um dem K^+ -Mangel entgegenzuwirken.

Ein anderes Bild zeichnet sich bei der kontinuierlichen Applikation von $^{11}CO_2$ ab. Die -K-Variante (Tabelle 29, S.101) zeigt hier eine langsamere Verlagerung von Assimilaten als die +K-Variante. Auch die Aufnahme von NO_3^- und die Abgabe von $H^{11}CO_3^-$ über die Wurzeln waren geringer als in der +K-Variante. Wurde der -K-Variante 2 h nach Versuchsbeginn K^+ angeboten, so führte dies zu einem Anstieg der NO_3^- -Aufnahme, der Verlagerungsgeschwindigkeit von Assimilaten und der Abgabe von $H^{11}CO_3^-$ in die Nährlösung. Dieses Bild deckt sich mit den Erwartungen nach dem Ben Zioni-Modell.

Bei *Brassica napus* L. zeigen Pflanzen unter hohem (2 mM) oder niedrigem (0,15 mM) NO_3^- -Angebot keine großen Unterschiede in den Malatgehalten von Blatt, Spross oder Wurzel (Abbildung 32, S.105). In der 2 mM-Variante ist die Malatkonzentration im Spross geringfügig höher, was auf einen stärkeren Transport in Richtung der Wurzel deutet. Allerdings ist die Malatkonzentration in der Wurzel geringer als in der 0,15 mM-Variante. Grund dafür könnte ein Malat-Pool in der Wurzel sein, der bei niedrigem NO_3^- -Angebot stärker gefüllt ist als bei hohem Angebot. Für einen solchen Malat-Pool spricht auch, dass in dekapitierten Pflanzen der Malatgehalt wegen der fehlenden Assimilatnachlieferung auf ca. $\frac{1}{4}$ fällt. Der leichte Anstieg der Malatkonzentration in dekapitierten Pflanzen nach 2 d kann durch die Mobilisierung von Speicherstoffen bedingt sein, die von der Pflanze jetzt verstärkt aufgebraucht werden, um in den Stoffwechsel der Wurzel eingespeist zu werden. L-Malat tritt bei diesen Prozessen als

Zwischenprodukt auf und dient im Rahmen der Wurzelatmung als Energiequelle.

Eine Auffälligkeit zeigt der Malatgehalt in den Blättern der Rapspflanzen 2 d nach dem Umsetzen auf das Medium mit dem geringeren NO_3^- -Angebot. Hier liegt der Gehalt deutlich niedriger als bei der kontinuierlich mit 2 mM ernährten Variante. Da die Malatkonzentration kontinuierlich mit 0,15 mM ernährten Variante aber auf demselben Niveau wie die 2mM-Variante liegt, scheint es sich hierbei nur um einen temporären Effekt während der Umstellung des Stoffwechsels zu handeln.

Die Umstellung auf ein höheres N-Angebot führt bei *Brassica napus* L. zu einem geringfügigen Anstieg der Malatkonzentration in Blatt und Spross (Abbildung 33, S.107). Den vorübergehenden Anstieg kann das Ben Zioni-Modell so erklären, dass bei gesteigerter NO_3^- -Aufnahme jetzt mehr Assimilate in der Wurzel benötigt werden. Der leichte Rückgang der Malatkonzentration in der Wurzel spricht dafür, dass der Malat-Pool durch die stärkere NO_3^- -Aufnahme reduziert wird und ein Auffüllen über einen höheren Assimilatstrom sich über einige Tage hinzieht. Nach dem Wechsel vom HATS zum LATS stellt sich dann die Malatkonzentration in den verschiedenen Fraktionen neu ein.

Neben dem Einfluss des NO_3^- -Angebots auf die Malatgehalte von *Brassica napus* L. kann auch die Induktion von -K-Pflanzen Aufschluss über die Funktion eines möglichen K^+ -shuttles bei Xylem- und Phloemtransport liefern. Nach einer Mangelperiode wird K^+ von der Pflanze in großen Mengen aufgenommen, um den Bedarf zu decken. Als erstes Organ kann die Wurzel ihren Mangel ausgleichen, bevor über den akropetalen Transport über das Xylem der Spross und die Blätter mit K^+ versorgt werden. Zusammen mit K^+ können dann nach dem Ben Zioni-Modell im Co-Transport größere Mengen NO_3^- von der Wurzel in die Blätter gelangen, wo die Reduktion stattfindet. Gleichzeitig wird aber auch der Energiebedarf der Wurzel steigen, da sie mehr ATP zur Aufnahme von Nitrat verbraucht, da bei einem Nitratangebot von 150 μM das HATS aktiv ist.

Vom Anstieg der NO_3^- -Aufnahme nach Beendigung eines K^+ -Mangels (Tabelle 21, S.80) und einer Zunahme der im Xylem transportierten NO_3^- -Menge (Tabelle 26, S.92) wurde schon berichtet. Gleichzeitig kommt es auch zu einer Zunahme des Malatgehaltes (Abbildung 34, S.108). Der schnelle Anstieg der Malatkonzentration in

den Wurzeln kann entweder aus dem Abbau von Speicherstoffen, durch eine höhere Anlieferung von Assimilaten aus dem Spross oder durch ein Zusammenspiel der beiden stammen.

Die Tatsache, dass auch die direkt nach dem Umsetzen dekapitierten Pflanzen einen signifikanten Anstieg im L-Malatgehalt der Wurzeln zeigen, lässt darauf schließen, dass zumindest ein Teil des L-Malats aus dem Abbau von Speicherstoffen der Wurzel stammt.

Für eine verstärkte Anlieferung von Malat über das Phloem spricht, dass der Malatgehalt im Spross als Vermittler zwischen Blatt und Wurzel nach 3 h ebenfalls stark angestiegen ist, während in den Blättern sogar ein leichter Rückgang zu verzeichnen ist. Der Rückgang der Malatkonzentration in den Blättern lässt sich aber durch einen verstärkten Export in Richtung der Wurzel erklären. Hinzu kommt noch, dass bei einem verstärkten Nitrattransport in die Blätter auch eine Zunahme der Nitratreduktion folgt. Im Anschluss an die Nitratreduktion werden jedoch organische Säuren benötigt, auf welche die NH_4^+ -Gruppe übertragen werden kann. Zur Synthese dieser 2-Oxo-Säuren wird ebenfalls L-Malat benötigt und der L-Malat-Pool in den Blättern schrumpft zusätzlich.

Das Maximum der Malatgehalte in allen Fraktionen wird 1 d nach der Umstellung auf +K-Medium erreicht, bevor die Pflanzen sich nach 2 d dem Niveau der +K-Variante annähern. Auch wenn der Malatgehalt der Wurzel nach 2 d bereits dem der +K-Variante entspricht, so deuten die Malatgehalte in Blatt und Spross immer noch auf einen verstärkten Verlagerung von Malat in die Wurzel.

Die Entwicklung der Malatgehalte nach K^+ -Induktion von Raps lassen sich gut mit dem Ben Zioni-Modell in Einklang bringen. Auch der Vergleich der Varianten im *steady state* spricht für den Einfluss von K^+ auf die Malatbildung und -Verlagerung.

Die Reaktion von ***Lupinus albus L.*** auf den Entzug von K^+ macht sich nach 6 h in einem Rückgang des Malatgehaltes in den Blättern bemerkbar (Abbildung 36, S.111) und führt nach 2 d Mangel zu einer Reduktion des Malatgehaltes von 6,74 auf 3,9 $\mu\text{M/g}$ FM. Auch im Spross (-0,6 $\mu\text{M/g}$ FM) und in der Wurzel (-0,29 $\mu\text{M/g}$ FM) ist ein Rückgang der Malatkonzentration zu beobachten, die allerdings deutlich geringer ausfällt. Als Spezies, die NO_3^- überwiegend in der Wurzel reduziert, besteht bei der Lupine allerdings nicht die Notwendigkeit, K^+ als Gegenion zu NO_3^- im Xylem einzusetzen. Dies zeigt sich in der bei geringem NO_3^- -Angebot kaum nachweisbaren

NRA in den Blättern und dem Fehlen eines NO_3^- -Stroms im Xylem. Erst bei hohem NO_3^- -Angebot lassen sich Blatt-NRA und Xylemtransport von NO_3^- feststellen.

Auch wenn K^+ als Ladungsausgleich für andere anorganische oder organische Anionen im Xylem dienen kann, so spielt es, zumindest was den Transport von NO_3^- betrifft, nicht die vom Ben Zioni-Modell postulierte Rolle.

Da unter K^+ -Mangel auch die NO_3^- -Aufnahme und die NRA in der Wurzel von Lupinen reduziert ist (Tabelle 13, S.61), lässt sich das Absinken der Malatgehalte durch den geringeren Bedarf der Wurzel erklären. Dass die Wurzel ihre Malatkonzentration langsamer reduziert als der Spross, könnte auch dadurch beeinflusst werden, dass in der Wurzel Prozesse anlaufen, die ein Wachstum der Wurzel fördern, um dem Mangel entgegenzuwirken. Die für ein stärkeres Wurzelwachstum benötigte Energie muss aus dem Abbau von Assimilaten stammen, wobei Malat als Zwischenprodukt auftritt. Es ist daher zu vermuten, dass über einen längeren Beobachtungszeitraum auch die L-Malatkonzentration in der Wurzel sinken wird, wenn der Stoffwechsel in den assimilierenden Organen weiter durch Kaliummangel beeinträchtigt wird.

Die Rolle von K^+ im Ben Zioni-Modell kann bei Mangelversuchen zwar in Frage gestellt werden, jedoch ist die Funktion von K^+ unter normalen Anzuchtbedingungen unstrittig. Auch wenn das Ben Zioni-Modell in einigen Punkten kritisch betrachtet wurde, so lassen sich mit ihm doch viele Punkte in der Wechselwirkung zwischen N- und C-Haushalt erklären.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Kalium auf die Aufnahme, den Transport und die Reduktion von Nitrat untersucht. Als Spezies mit einer bevorzugten Reduktion des Nitrats in den Blättern wurde *Brassica napus* L. (Sorte Liberator-00) gewählt, während *Lupinus albus* L. (Sorte Amiga) als Beispiel für eine Spezies mit überwiegender Nitrat-Reduktion in den Wurzeln diente.

Unter Einsatz des kurzlebigen ^{13}N wurden Aufnahmekinetiken von NO_3^- an Raps und Lupine erstellt, wobei zwischen Influx, Efflux und Netto-Aufnahme unterschieden wurde. Nach NH_4^+ -Ernährung reagieren beide Spezies beim ersten Kontakt mit NO_3^- mit einem Anstieg der Aufnahmerate, wobei ein Efflux von NO_3^- erst nach einigen Stunden einsetzt. Weiterhin wurde festgestellt, dass zur Induktion der NO_3^- -Aufnahme bereits ein kurzfristiger NO_3^- -Puls ausreicht.

Raps und Lupine zeigen bei der Nitrataufnahme das charakteristische Bild von HATS (High Affinity Transport System) bei niedrigem und LATS (Low Affinity Transport System) bei hohem Nitratangebot. Die Aufnahmerate von Raps liegt dabei deutlich über den Aufnahmeraten von häufig untersuchten Spezies wie Gerste oder Weizen, während die Lupine eine deutlich niedrigere Aufnahmerate aufweist.

Werden NO_3^- -ernährte Pflanzen unter K^+ -Mangel angezogen, so sind NO_3^- -Influx und NO_3^- -Efflux reduziert. Wird den K-Mangelpflanzen wieder K^+ angeboten, so steigt der Influx stärker als der Efflux und es kommt zu einer höheren Nettoaufnahme. Der Efflux nimmt erst zeitlich verzögert zu, so dass sich hier ein ähnliches Bild wie bei der Induktion der NO_3^- -Aufnahme bei NH_4^+ -ernährten Pflanzen ergibt.

In *Lupinus albus* L. NO_3^- , mit bevorzugter Reduktion von NO_3^- in der Wurzel, ist im Xylem-Exudat kein NO_3^- nachweisbar solange das NO_3^- -Angebot unter 250 μM liegt. Bei *Brassica napus* L., mit bevorzugter NO_3^- -Reduktion im Blatt, tritt NO_3^- auch bei geringem Angebot im Xylem auf.

In den Blättern der Lupine ist die Nitratreduktaseaktivität (NRA) erst bei einem Nitrat-Angebot von über 1 mM festzustellen, während sich die NRA in Spross und Wurzel der Lupine und in allen Organen von Raps auch bei einem NO_3^- -Angebot von weniger als 100 μM bestimmen lässt.

Unter K^+ -Mangel ist die NRA in beiden Spezies reduziert. Dabei kommt es zu einer Überlagerung von einer Hemmung der NRA durch Na^+ , das in Nährlösungen als

ausgleichendes Kation für das fehlende K^+ verwendet wurde, und einer vermutlich reduzierten Synthese der NR.

Der Einsatz radioaktiver C-Isotope (^{11}C bzw. ^{14}C) lieferte widersprüchliche Daten. Bei einem Pulsexperiment zeigte die -K-Variante von *Brassica napus* L. eine höhere Verlagerung von Assimilaten in die Wurzel als die +K-Varianten. Bei einer kontinuierlichen Applikation lag der Transfer von Assimilaten jedoch deutlich niedriger als bei der +K-Variante bzw. einer Variante, die während des Versuchs auf Medium mit K^+ umgestellt wurde.

Der Gehalt an Malat in Blatt, Spross oder Wurzel wurde bei unterschiedlichem NO_3^- -Angebot untersucht. Pflanzen im *steady state* lassen keinen großen Unterschied zwischen einem Angebot von 0,15 mM und 2,0 mM NO_3^- erkennen. Bei 0,15 mM NO_3^- ist allerdings das HATS aktiv, das einen höheren Energieeinsatz zur Aufnahme von NO_3^- als das bei 2 mM aktive LATS erfordert. Die höhere Malatkonzentration in der Wurzel der 150 μM NO_3^- -Variante kann daher mit dem höheren Energiebedarf der Wurzeln zusammenhängen.

Werden Raps und Lupine mit 150 μM NO_3^- angezogen, so ist unter K^+ -Mangel der Malatgehalt deutlich reduziert. Wird der K^+ -Mangel aufgehoben, so erfolgt ein starker Anstieg der Malatgehalte. Nach 1 d liegen die Werte deutlich über den Malatgehalten der +K-Variante, sie gehen aber in den folgenden Tagen langsam auf das Niveau der +K-Variante zurück. Die Induktion eines K^+ - Mangels führt zu einem langsamen Absinken der Malatgehalte in Raps oder Lupine.

Wenn auch nicht unumstritten, so kann als Fazit der hier vorgestellten Untersuchungen das von **Ben Zioni et al.** (1971) vorgestellte Modell eines K^+ -Shuttles zwischen Xylem und Phloem zur Erklärung vieler der beschriebenen Effekte beitragen.

7 Summary

The submitted study examines the effect of potassium on nitrate uptake, nitrate transport and nitrate reduction in plants. *Brassica napus* L (species Liberator-00) was selected as a species with predominant nitrate reduction in the leaves, while *Lupinus albus* L. (species Amiga) was representing plants with a predominant reduction in the roots.

Usage of the short-lived radioisotope ^{13}N permitted to generate NO_3^- -uptake kinetics of oilseed rape and white lupin with distinction between influx, efflux and net uptake. Upon first contact with NO_3^- following NH_4^+ -nutrition both species show an increasing uptake rate of nitrate. Initially nitrate efflux is missing but it starts after several hours. Further on it was stated that a short term pulse of NO_3^- is sufficient for induction of NO_3^- -uptake.

Oilseed rape and white lupin show the typical picture of nitrate uptake kinetics at low supply (HATS=high affinity transport system) or high supply (LATS=low affinity transport system). Nitrate uptake rate of oilseed rape is much higher than the one of commonly studied species like wheat or barley, while nitrate uptake rate of white lupin is much lower.

Plants grown under K^+ -deficiency show lower NO_3^- -influx and lower efflux. As soon as K^+ is applied NO_3^- -influx increases stronger than efflux, causing a higher net uptake of NO_3^- . Nitrate efflux increases after a lag period, showing a similar reaction like the induction of NO_3^- -uptake after previous NH_4^+ -nutrition.

In *Lupinus albus* L. where the roots are the main site for nitrate reduction it is not possible to detect NO_3^- in xyleme exudate as long as NO_3^- supply is below 250 μM . For *Brassica napus* L., with preferred reduction of NO_3^- in the leaves, NO_3^- can be detected in xyleme exudate even at low supply.

Nitrate reductase activity (NRA) in leaves of white lupin is not present at nitrate supply below 1 mM. However NRA can be determined in roots and shoot of white lupin as well as in all plant parts of oilseed rape even at NO_3^- -supply lower than 100 μM .

NRA in both species is reduced under K^+ -deficiency. For the deficient plants an interaction of inhibition of nitrate reductase (NR) by Na^+ , which is used to replace K^+ as a cation in nutrient solutions, and a probably reduced synthesis of NR seems to take place.

Using radiolabelled carbon-isotopes showed mismatching data. In a pulse experiment the K^+ -deficient plants of *Brassica napus* L. showed higher export of assimilates to the roots than the K^+ -supplied control. At continuous application the transfer of assimilates to the root was much less in the -K-plants compared to +K plants or plants that have been switched from -K to +K medium during the experiment.

The concentration of malate in leaves, stem or roots was checked at different levels of nitrate supply. Plants at *steady state* showed little difference between nitrate supply of 0.15 mM or 2.0 mM. Nevertheless at 0.15 mM the HATS is responsible for NO_3^- uptake, demanding an increased energy input for NO_3^- uptake than the LATS which is active at 2 mM. Increased malate concentration in the roots of the 150 μ M-plants could be associated with the increased energy demand of the roots.

Oilseed rape and white lupin, grown with 150 μ M NO_3^- , showed reduced malate content under K^+ -deficiency. As soon as K^+ is resupplied a strong increase of malate can be determined. One day after supply with K^+ malate reaches a level above the one of continuously K^+ -supplied plants, but during the next days the concentration declines. Induction of K^+ -deficiency slowly leads to a reduction of malate contents in oilseed rape and white lupin.

Also not undisputed, the model of a K^+ -shuttle between xyleme and phloeme presented by **Ben Zioni et al.** (1971) can contribute to the explanation of the described effects.

8 Literaturverzeichnis

- Armstrong, M.J., Kirkby, E.A. (1979): Estimation of potassium recirculation in tomato plants by comparison of rates of potassium and calcium accumulation in the tops with their fluxes in the xylem stream. *Plant Physiology* 63, 1143-1148
- Barneix, A.J., Breteler, H. (1985): Effect of cations on uptake, translocation and reduction of nitrate in wheat seedlings. *New Phytologist* 99, 367-379
- Ben Zioni, A., Vaadia, Y., Lips, S.H. (1971): Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiologia Plantarum* 24, 288-290
- Blevins, D.G., Hiatt, A.D., Lowe, R.H. (1974): The influence of nitrate and chloride uptake on expressed sap pH, organic acid synthesis, and potassium accumulation in higher plants. *Plant Physiology* 54, 82-87
- Blevins, D.G., Hiatt, A.J., Lowe, R.H., Leggett, J.E. (1978): Influence of K on uptake, translocation and reduction of nitrate by barley seedlings. *Agronomy Journal* 70, 393-396
- Botella, M.A., Cerda, A., Lips, S.H. (1994): Kinetics of NO_3^- and NH_4^+ uptake by wheat seedlings. Effect of salinity and nitrogen source. *Journal of Plant Physiology* 144, 53-57
- Browne, E., Firestone, R.B. (1986): Table of Radioactive Isotopes. Wiley Interscience Publication; New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- Buchner, H., Buchner, E. (1897): In: Stryer, L. *Biochemistry*; H.W. Freeman and Company, New York, 1988, S.349
- Calvin, M. (1945): In: Stryer, L. *Biochemistry*; H.W. Freeman and Company, New York, 1988, S.533
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L. (1975): Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6, 71-80
- Cordoba, F., Cardenas, J., Fernandez, E. (1986): Kinetic characterization of nitrite uptake and reduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 82, 904-908
- Crawford, N.M. (1995): Nitrate : Nutrient and signal for plant growth. *American Journal of Plant Physiologists* 7, 859-868
- Crawford, N.M., Glass, A.D.M. (1998): Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 10, 389-395.
- Cruz, C., Lips, S.H., Martinsloucao, M.A. (1993): Interactions between nitrate and ammonium during uptake by carob seedlings and the effect of the form of earlier nitrogen nutrition. *Physiologia Plantarum* 89, 544-551

- de Saussure, T. (1804): In : Meidner, H. (1985) „Historical Sketches 4“, Journal of Experimental Botany 36, S.694-695
- Dijkshoorn, W. (1958): Nitrate accumulation, nitrogen balance and cation-anion ratio during regrowth of perennial ryegrass. Netherland Journal of Agricultural Science 211-221
- Ehrendorfer, F. (1983): Übersicht des Pflanzenreiches : Angiospermae. In : Strasburger E., Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1983
- Engels, C., Marschner, H. (1992): Adaptation of potassium translocation into the shoot of maize (*Zea mays*) to shoot demand: Evidence for xylem loading as a regulating step. *Physiologia Plantarum* 86, 263-268
- Engels, C., Münkle, L., Marschner, H. (1992): Effect of root zone temperature and shoot demand on uptake and xylem transport of macronutrients in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 43, 537-547
- Engels, C., Marschner, H. (1993): Influence of the form of nitrogen supply on root uptake and translocation of cations in xylem exudate of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 44, 1695-1701.
- Epstein, E., Rains, D.W., Elzam, O.E. (1963): Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 49, 684-692.
- Fernando, M., Mehroke, J., Glass, A.D.M. (1992): De novo synthesis of plasma membrane and tonoplast polypeptides of barley roots during short-term K⁺ deprivation. In search for the high-affinity K⁺ transport system. *Plant Physiology* 100, 1269-1276
- Glass, A.D.M. (1976): Regulation of potassium absorption in barley roots. An allosteric model. *Plant Physiology* 58, 33-37
- Forde, B.G., Clarkson, D.T. (1999): Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research* 30, 1-90.
- Hageman, R.H., Reed, A.J. (1980): Nitrate reductase from higher plants. In : *Methods in Enzymology* Vol. 69 „Photosynthesis and Nitrogen Fixation“ Part C, 270-280; Herausgeber : San Pietro, A, Colowick S.P, Kaplan, N.O; Academic Press, New York
- Haynes, R.J. (1986^a): Uptake and Assimilation of Mineral Nitrogen by Plants. In : Haynes, R.J. *Mineral Nitrogen in the Plant-Soil System*. Academic Press Inc. Orlando, Florida. 303-358
- Haynes, R.J. (1986^b): Nitrification. In : Haynes, R.J. *Mineral Nitrogen in the Plant-Soil System*. Academic Press Inc. Orlando, Florida. 127-157
- He, T., Cramer, G.R. (1993): Growth and ion accumulation of two rapid-cycling Brassica species differing in salt tolerance. *Plant and Soil* 153, 19-31

- Heiss, W.B., Beil, C. Herholz, Z. (1985): Atlas der Positronen Emissions Tomographie des Gehirns. Springer Verlag, Berlin
- Hoagland, D.R., Broyer, T.C. (1936): General nature of the process of salt accumulation by roots with description of experimental methods. *Plant Physiology* 11, 471-507.
- Kaiser, W.M., Huber, S.C. (1994^a): Modulation of nitrate reductase in vivo and in vitro. Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg^{2+} and 5'-AMP. *Planta* 193, 358-364
- Kaiser, W.M., Huber, S.C. (1994^b): Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiology* 106, 817-821
- Kaiser, W.M., Weiner, H., Kandlbinder, A., Tsai, C.B., Rockel, P. Sonoda, M., Planchet, E. (2002): Modulation of nitrate reductase : Some insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany* **53**, 370, 875-882.
- King, B.J., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Warner, R.L., Glass, A.D.M. (1993): Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. *Plant Physiology* 102, 1279-1286
- Karlson, P. (1984): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 68-74
- Kirkby, E.A., Armstrong, M.J. (1980): Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate assimilation in the shoot of Castor Oil Plants (*Ricinus communis*). *Plant Physiology* 65, 286-290
- Kirkby, E.A., Armstrong, M.J., Leggett, J.E. (1981): Potassium recirculation in tomato plants in relation to potassium supply. *Journal of Plant Nutrition* 3, 955-966
- Kirkby, E.A., Knight, A.H. (1977): Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiology* 60, 349-353
- Keutgen, N. (1993): Untersuchungen zu Photosynthese, Respiration und Transport von Assimilatkohlenstoff bei Weizenpflanzen nach Infektion mit Schwarzrost (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*) in Abhängigkeit vom Infektionstyp. Dissertation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 23-24
- Kochian, L.V., Lucas, W.J., (1982): Potassium transport in corn roots. I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. *Plant Physiology* 70, 1723-1731
- Kuo, T.M., Warner, R.L., Kleinhofs, A. (1982): In vitro stability of nitrate reductase from barley leaves. *Phytochemistry* 21, 531-533
- Lee, R.B., Drew, M.C. (1986): Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. II. Effect of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx. *Journal of Experimental Botany* 37, 1768-1779

- Lee, R.B., Drew, M.C. (1989): Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. *Journal of Experimental Botany* 40, 741-752
- Li, X.Z., Oaks, A. (1993): Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays* - Influence of NO_3^- . *Plant Physiology* 102, 1251-1257
- Li, X.Z., Oaks, A. (1994): Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays* - Influence of light. *Plant Physiology* 106, 1145-1149
- Liebig, Justus v. (1840): *Die organische Chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie*. - Braunschweig
- Long, D.M, Oaks, A. (1990): Stabilization of nitrate reductase in maize roots by Chymostatin. *Plant Physiology* 93, 846-850
- MacKown, C.T. (1983): Partitioning of previously accumulated nitrate to translocation, reduction, and efflux in corn roots. *Planta* 157, 8-14
- Malthus, T.R. (1789): Über die Bedingungen und Folgen der Volksvermehrung. In : Schumpeter, J.A: *Geschichte der ökonomischen Analyse*; Göttingen 1965
- Marschner, H. (1986): *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition. Academic Press Ltd. Orlando Florida
- Martin-Nieto, J., Flores, E., Herrero, A. (1992): Biphasic kinetic behavior of nitrate reductase from heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacteria. *Plant Physiology* 100, 157-163
- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M., Shaff, J.E. (1990^a): Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiology* 93, 281-289
- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M., Shaff, J.E. (1990^b): Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* 93, 290-294
- Mehrag, A.A., Blatt, M.R. (1995): NO_3^- transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: Kinetic control by pH and membrane voltage. *Journal of Membrane Biology* 145, 49-66.
- Memon, A.R., Saccomani, M., Glass, A.D.M. (1985): Efficiency of K^+ utilization by barley varieties : The role of the subcellular compartmentation. *Journal of Experimental Botany* 37, 1860-1876
- Oaks, A., Wallace, W., Stevens, D. (1972): Synthesis and turnover of nitrate reductase from corn roots. *Plant Physiology* 50, 649-654
- Phlak, F. (1992): Comparison of diurnal changes in nitrate and potassium contents in lucerne shoots. *Biologia Plantarum* 34, Nr.1-2, 101-107

- Richter, G. (1988): Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 5.Auflage.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W.M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* 53, 103-110
- Roeb, G.W., Wieneke, J., Führ, F. (1986^a): A system for continuously applying ¹¹C-labelled carbon dioxide to plants without on-line connection to the target chamber. In: *Short Lived Isotopes in Biology. Proceedings of an International Workshop, 26-30 August, 1985.* Herausgeber : P.E.H. Minchin, DSIR Bull. 238, Lower Hutt, New Zealand. 41-49
- Roeb, G.W., Wieneke, J., Führ, F. (1986^b): Carbon translocation and accumulation in wheat plants measures using ¹¹C-labelled carbon dioxide. In: *Short Lived Isotopes in Biology. Proceedings of an International Workshop, 26-30 August, 1985.* Herausgeber: P.E.H. Minchin, DSIR Bull. 238, Lower Hutt, New Zealand. 72-79
- Sachs, J.v. (1881): In : Meidner, H. (1985) „Historical Sketches 12“, *Journal of Experimental Botany* Vol. 37, No. 173, S. 1996-1997
- Santi, S., Locci, G., Monte, R., Pinton, R., Varanini, Z. (2003): Induction of nitrate uptake in maize roots: Expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. *Journal of Experimental Botany* 54, 1851-1864
- Saravitz, C.H., Chaillou, S., Musset, J., Raper, C.D., Morot-Gaudry, J.F. (1994): Influence of nitrate on uptake of ammonium by nitrogen-depleted soybean: Is the effect located in roots or shoots? *Journal of Experimental Botany* 45, 1575-1584
- Scholl, R.L., Harper, J.E., Hageman, R.H. (1974): Improvements of the nitrite color development in assays of nitrate reductase by Phenanzine Methosulfate and Zinc Acetate. *Plant Physiology* 53, 825-828
- Schultz, A. (1895): Zwischenfruchtanbau auf leichten Böden. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft*, Heft 7, 4.Auflage 1927
- Spill, D., Kaiser, W.M. (1994): Partial purification of 2 proteins (100 kDa and 67 kDa) cooperating in the ATP-dependent inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta* 192, 183-188
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M. (1987): Regulation of K⁺ influx in barley : Evidence for a direct control of influx by K⁺ concentration of root cells. *Journal of Experimental Botany* 38, 191, 935-947.
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J., Fernando, M. (1989): Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using ¹³NO₃⁻. *Plant Physiology* 90, 806-813
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J., Rufty, T.W. (1990): Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of ¹³NO₃⁻-influx. *Plant Physiology* 93, 1426-1432

- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J. (1991): Studies on the uptake of nitrate in barley. III. Compartmentation of NO_3^- . *Journal of Experimental Botany* **42**, 244, 1455-1463
- Somers, D.A., Kuo, T.M., Warner, R.L., Oaks, A. (1993): Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiology* **72**, 949-952
- Sprengel, C. (1832): *Chemie für Landwirthe, Forstmänner und Cameralisten*. Göttingen
- Stöcklin, G. (1988): Spezielle Syntheseverfahren mit kurzlebigen Radionukliden und Qualitätskontrolle. In: *Handbuch der medizinischen Radiologie*. Herausgeber: L.Diethelm, F.Heuck, F.Strnad, H.Vieten und A.Zuppinger. Band XV / 1B, 31-117
- Thibaud, J.B., Grignon, C. (1981): Mechanism of nitrate uptake in corn roots. *Plant Science Letters* **22**, 279-289
- Ullrich, C.I., Novacky, A.J. (1990): Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , H_2PO_4^- , and NO_3^- uptake and Fusicoccin in root hairs of *Limnium stoloniferum*. *Plant Physiology* **94**, 1561-1567
- Ullrich, W.R. (1987): Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: Mechanism and relationship with nitrate metabolism. In: Ullrich, Aparicio, Syrett, Castillo, eds. *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Springer-Verlag, Berlin. 32-38
- van Beusichem, M.L., Baas, R., Kirkby, E.A., Nelemans, J.A. (1985): Intracellular pH-regulation during NO_3^- -assimilation in shoot and roots of *Ricinus communis*. *Plant Physiology* **78**, 768-773
- Wallace, W. (1986): Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Physiologia Plantarum* **66**, 630-636
- Watt, D.A., Amory, A.M., Cresswell, C.F. (1993): Constitutive and inducible aspects of nitrate-nitrogen uptake by *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Physiologia Plantarum* **89**, 507-511
- Wieneke, J., Nebeling, B. (1990): Improved method for ^{13}N -application in short-term studies on NO_3^- fluxes in barley and squash plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **153**, 117-123
- Wieneke, J. (1994): Nitrate (NO_3^-)-N-13 Flux studies and response to Tungstate treatments in wild type barley and in an NR-deficient mutant. *Journal of Plant Nutrition* **17**, 127-146
- Wienhard, K, Wagner, R, Heiss, W.B. (1989): *PET: Grundlagen und Anwendungen der Positronen Emmissions Tomographie*. Springer Verlag, Berlin
- Wöhler, F. (1828): In : „Stickstoff - Die Chemie stellt die Ernährung sicher.“, Schriftenreihe des Unternehmensarchivs der BASF Aktiengesellschaft. Hrsg: Nagel, A.v. 112-117, Ludwigshafen, 1991
- Wolf, O., Munns, R., Tonnet, M.L., Jeschke, W.D. (1991) : The role of the stem in partitioning of Na^+ and K^+ in salt-treated barley. *Journal of Experimental Botany* **42**, 239, 697-704

- Zachheo, P. Cocucci, M., Cocucci, S. (1985): Effects of Cr on proton extrusion, potassium uptake and transmembrane electric potential in maize root segments. *Plant Cell Environment* 8, 721-726
- Zerulla, W., Barth, T., Dressel, J., Erhardt, K., Horchler, K., Pasda, G. Rädle, M., Wissemeier, A.H. (2001): 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. An Introduction. *Biology and Fertility of Soils* 34, 79-84

9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Modell zur Funktion eines möglichen K-Shuttles in der Pflanze (Ben Zioni et al., 1971), mit Verbindung zwischen Nitrataufnahme, Nitrattransport und Nitratreduktion (rechte Seite) und CO₂-Fixierung, Assimilattransport und HCO₃⁻-Abgabe in den Wurzeln (linke Seite). 10
- Abbildung 2 : Schematische Darstellung der ferngesteuerten Beladung und Entladung des Zyklotrons zur Produktion des Stickstoffisotops ¹³N aus einem Wasser-Target (nach **Wieneke** und **Nebeling**, 1990). 26
- Abbildung 3: Darstellung der Messapparatur zur Durchfluss-Messung von Nitrat an Pflanzen. Die Nährlösung wird von den Markierungsgefäßen über Pumpen zum Photometer geleitet, wo aus der Absorption bei 210 nm und 250 nm der Nitratgehalt berechnet wird. Vom Photometer wird die Nährlösung an Detektoren (Bismuth-Germanat Detektor mit Vorverstärker) vorbeigeleitet, bevor sie wieder in die Markierungsgefäße gelangt. Von den an eine Hochspannungsquelle angeschlossenen Detektoren werden die Messsignale über einen Messverstärker an einen Mehrkanal-Zähler weitergeleitet. Die Daten gelangen schließlich in den PC, wo sie über eine Computer-Steckkarte (Canberra System S 100) umgewandelt und gespeichert werden (modifiziert nach **Wieneke** und **Nebeling**, 1990). 30
- Abbildung 4: Produktion von ¹¹CO₂. Durch Beschuss eines N₂-Targets (Zyklotron) mit energiereichen Protonen entsteht das kurzlebige ¹¹CO₂, das in einem Vorratstank gespeichert wird. Aus diesem Vorrat wird das ¹¹CO₂ in die Sammelapparatur geleitet, wo es ausgefroren und in ein Transportgefäß übertragen wird (nach **Keutgen**, 1993). 31
- Abbildung 5: In der Gaswechselapparatur können für Photosynthesestudien ¹¹CO₂ und / oder ¹⁴CO₂ in einem Pulsexperiment oder kontinuierlich appliziert werden. Über zahlreiche Mess- und Regulationseinrichtungen kann die ¹¹CO₂-Konzentration bei Bedarf konstant gehalten werden (modifiziert nach **Keutgen**, 1993). 33
- Abbildung 6: Verlagerung von Assimilaten vom Spross in die Wurzel. Die Blattküvette ist an die ¹¹CO₂/¹⁴CO₂-Applikationsanlage (Abbildung 5) angeschlossen. Es werden Temperatur, Feuchte und CO₂-Gehalt am Eingang und am Ausgang der Küvette gemessen. Die Detektoren erfassen die Verlagerung von ¹¹C in der Pflanze und das Freisetzen von markierten Abbauprodukten in die Nährlösung. Der Nährlösungsvorrat wird mit Luft durchperlt und die Abluft durch eine Waschflasche mit NaOH geleitet. Gleichzeitig können über ein 3-Wege Ventil Nährlösungsproben gezogen werden. 35
- Abbildung 7: Zunahme der Frischmasse von Raps (*Brassica napus* L.) bei Anzucht mit 100 µM NO₃⁻. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Messwerte von 16-24 Einzelpflanzen dar. 42
- Abbildung 8: *In vitro* NRA (in µMol Nitrat / g FM h⁻¹) von **Lupine** und **Raps** bei Anzucht mit 150 µM Nitrat. Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert der NRA von 8 Lupinen bzw. 12 Rapspflanzen dar. Zum Zeitpunkt des Enzymtests waren die Lupinen 27 d, die Rapspflanzen 21 d alt. 48

- Abbildung 9: In vivo NRA in Blatt, Spross und Wurzel von *Brassica napus* L. bei Anzucht mit verschiedenen Nitratkonzentrationen. Von jeder Variante wurden mindestens 6 Pflanzen geerntet. Die Ernte erfolgte 20 d nach der Saat, 2¹/₂ h nach Beginn der Photoperiode. 50
- Abbildung 10: Regulierung von Lichtstärke und Feuchte im Tagesgang. Die Temperatur betrug in der Dunkelphase 16,5°C und wurde in der Lichtphase auf 21,5°C erhöht. Bei der Befeuchtung der Luft in der Klimakammer traten am Tag kurzfristige Temperaturschwankungen von $\pm 1,5$ °C auf. 54
- Abbildung 11: Circadiane Schwankungen der NRA von Rapspflanzen (*Brassica napus* L.), die mit 250 µM Nitrat unter ausreichender **Kaliumernährung** (700 µM) angezogen wurden. In Variante **(A)** wurden bei der Durchführung des NRA-Test Kaliumsalze (30 mM KNO₃ und 100 mM KH₂PO₄) verwendet, während in Variante **(B)** der NRA-Test mit denselben Konzentrationen der entsprechenden Natriumsalze vorgenommen wurde. Die Pflanzen beider Varianten wurden bis zur Ernte auf derselben Nährlösung angezogen. Bei jeder Probennahme wurden jeweils 6 Pflanzen pro Variante geerntet und für den NRA-Test eingesetzt. 56
- Abbildung 12: Circadiane Schwankungen der NRA von Rapspflanzen (*Brassica napus* L.), die mit 250 µM Nitrat unter **Kaliummangel** angezogen wurden. In Variante **(C)** wurden bei der Durchführung des NRA-Test Natriumsalze (30 mM NaNO₃ und 100 mM NaH₂PO₄) verwendet, während in Variante **(D)** der NRA-Test mit denselben Konzentrationen der entsprechenden Kaliumsalze vorgenommen wurde. Die Pflanzen beider Varianten wurden bis zur Ernte auf derselben Nährlösung angezogen. Bei jeder Probennahme wurden jeweils 6 Pflanzen pro Variante geerntet und für den NRA-Test eingesetzt. 57
- Abbildung 13 : Einfluss der K⁺-Ernährung auf die NRA von *Lupinus albus* L. (Mittelwerte von je 12 Pflanzen / Variante) 60
- Abbildung 14: Induktion der Nitrataufnahme bei *Brassica napus* L.. Die eingezeichneten Aufnahmekurven wurden mit einer *curve-fit* Routine berechnet. Die induzierten Pflanzen zeigen mit $V_{\max} = 23,9 \mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}^{-1}$ und $K_M = 44,4 \mu\text{Mol NO}_3^-$ eine höhere Aufnahme in Verbindung mit einer geringeren Substrataffinität als die nicht induzierten Pflanzen ($V_{\max} = 7,5 \mu\text{Mol NO}_3^- / \text{g FM h}^{-1}$, $K_M = 34,9 \mu\text{Mol NO}_3^-$). Jeder Messwert stellt die Aufnahme von 3 Einzelpflanzen dar. 63
- Abbildung 15: Auswirkungen von N-Mangel und eines 1 h Nitrat-Pulses auf die Induktion der Nitrataufnahme von Ammonium-ernährten Rapspflanzen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 Versuchspflanzen dar. 67
- Abbildung 16: Nitrataufnahme von Rapspflanzen bei hohem Nitratangebot. Von den beiden Kurvenanpassungen wurde eine nach einer Geradengleichung (Tabelle 17, Gleichung 4.5), die andere nach einer Geradengleichung unter Berücksichtigung der Michaelis-Menten Kinetik für geringes Nitrat-Angebot (Tabelle 17, Gleichung 4.6) errechnet. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 Einzelpflanzen dar. 69
- Abbildung 17: Nitrataufnahmekinetik von induzierten und nicht-induzierten 25 d alten **Lupinen** (*Lupinus albus* L. cv. AMIGA) bei geringem N-Angebot. Die Kurven wurden auf der Basis der Gleichungen der Michaelis-Menten Kinetik errechnet. Jeder Messpunkt steht für die Aufnahme von 3 Lupinen. 73

Abbildung 18: Nitrataufnahme von 23 d alten Lupinen bei hohem NO_3^- -Angebot. Die Grafen wurden nach den Geradengleichung (Tabelle 17, Gleichung 19 und Gleichung 20) erstellt. Jeder Messpunkt entspricht der Aufnahme rate von einem Set aus 3 Lupinen.	74
Abbildung 19: Induktion der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme bei nicht induzierten Rapspflanzen (<i>Brassica napus</i> L.) Die Pflanzen wurden mit $150\ \mu\text{M}\ \text{NH}_4^+$ angezogen und zu Versuchsbeginn zum ersten Mal mit NO_3^- ernährt. (kumulative Darstellung).	76
Abbildung 20: Entwicklung der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Fluxe von nicht induzierten Rapspflanzen (<i>Brassica napus</i> L.), die 4 h in Kontakt mit NO_3^- waren. Die Aufnahme rates stammen von denselben Pflanzen, die in Abbildung 19 dargestellt sind.	76
Abbildung 21: Auswirkungen der NO_3^- -Induktion der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von nicht induzierten Rapspflanzen (<i>Brassica napus</i> L.), die 20 h vor der Markierung von $150\ \mu\text{M}\ \text{NH}_4^+$ auf $150\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ umgestellt wurden.	76
Abbildung 22: $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von induzierten Rapspflanzen (<i>Brassica napus</i> L.), die mit $150\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ angezogen wurden.	76
Abbildung 23a-c: Additive Raten der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von nicht induzierten Rapspflanzen (a), Gerstenpflanzen (b) und Lupinen (c) beim ersten Kontakt mit NO_3^- (Anzucht mit $150\ \mu\text{M}\ \text{NH}_4^+$). Zur Bestimmung der Aufnahme rates wurden 4 Rapspflanzen (Alter 20 d), 6 Gerstenpflanzen (Alter 20 d) und 3 Lupinen (Alter 26 d) verwendet. Die Pflanzen wurden auf derselben Nährlösung angezogen und kamen am Versuchstag zum ersten Mal in Kontakt mit NO_3^-	78
Abbildung 24a-c: Entwicklung der additiven Raten der $^{13}\text{NO}_3^-$ -Aufnahme von NH_4^+ -ernährten Rapspflanzen (a), Gerstenpflanzen (b) und Lupinen (c) 4 h nach dem ersten Kontakt mit NO_3^- (Anzucht mit $150\ \mu\text{M}\ \text{NH}_4^+$). Die Bestimmung der Aufnahme rates erfolgte an 4 Rapspflanzen (Alter 20 d), 6 Gerstenpflanzen (Alter 20 d) und 3 Lupinen (Alter 26 d). Die Pflanzen wurden auf derselben Nährlösung angezogen und kamen am Versuchstag zum ersten Mal in Kontakt mit NO_3^- (vgl. Abbildung 23a-c).	79
Abbildung 25: Einfluss der Kaliumaufnahme auf die OH^- -Abgabe von <i>Brassica napus</i> L. Die Pflanzen wurden kontinuierlich mit $150\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ angezogen und 14 d vor Versuchsbeginn von ausreichender K-Ernährung ($700\ \mu\text{M}\ \text{K}^+$) auf K-Mangel ($0\ \mu\text{M}\ \text{K}^+$) umgestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von je 4 Pflanzensets (ein Set bestand aus 3 Pflanzen) an. Am Versuchstag waren die Pflanzen 21 - 23 d alt und befanden sich im 2.Laubblattstadium.	85
Abbildung 26 A-C: Verlagerung von $^{86}\text{Rb}^+$ in <i>Brassica napus</i> nach einer 30 min Pulsmarkierung. Wegen der unterschiedlichen Wachstumsraten unter den 3 Anzuchtbedingungen waren die Rapspflanzen zwischen 23 d (A), 19 d (B) und 21 d (C) alt, befanden sich aber alle im 2.Laubblattstadium. Zu jeder Probenahme wurden 12 Rapspflanzen pro Variante geerntet.	87
Abbildung 27: Chromatogramme des Xylemsaftes von <i>Brassica napus</i> L. (A) und <i>Lupinus albus</i> L. (B) bei Anzucht mit $250\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$ unter K-Mangel. Die Peaks sind folgenden Anionen zuzuordnen: HPO_4^- 3,5 min, NO_3^- 10,5 min, SO_4^{2-} 13,5 min, org. Säuren 18-22 min.	95

- Abbildung 28: Abgabe von ^{14}C über die Blätter und die Wurzeln von *Brassica napus* L. nach einem 1 h Puls. Es ist angegeben welcher Anteil des ursprünglich aufgenommenen $^{14}\text{CO}_2$ 1 d (links) bzw. 2 d (rechts) nach der Applikation durch Blatt- oder Wurzelatmung wieder von den Pflanzen an das Außenmedium abgegeben wurde. 97
- Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Abgabe von ^{14}C in über die Wurzeln von *Brassica napus* L. nach einer 1 h Markierung von $^{14}\text{CO}_2$ über die Blätter. Die Pflanzen wurden mit 250 μM NO_3^- angezogen und entweder kontinuierlich mit 700 μM K^+ (+K-Variante) ernährt, oder für 10 d auf Medium ohne K^+ (-K-Variante) gesetzt. .. 98
- Abbildung 30: Bestimmung der Aufnahme und Verlagerung von $^{11}\text{CO}_2$ bei *Brassica napus* L. Die untersuchten Pflanzen befanden sich im 2-Blatt-Stadium und waren mit 250 μM NO_3^- und 700 μM K^+ ernährt. 100
- Abbildung 31: Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die Bestimmung des Gehaltes von L-Malat in *Brassica napus* L. cv. Liberator-00. Für beide Varianten (links: Ernährung mit 700 μM K^+ ; rechts K^+ -Mangel) wurden je 24 Pflanzen für die L-Malatbestimmung eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert dar. Zum Zeitpunkt des Tests waren die Versuchspflanzen 21 d alt. 103
- Abbildung 32: Einfluss einer **Reduktion** des Nitratangebotes auf die L-Malatgehalte von Raps (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden mit 2 mM NO_3^- angezogen und im Laufe des Versuches auf eine Nährlösung mit 150 μM NO_3^- umgesetzt. Damit alle Pflanzen am gleichen Tag in der Mitte der Photoperiode geerntet werden konnten, erfolgte das Umsetzen der Versuchspflanzen auf die neue Nährlösung zwischen 6 und 48 h vor der Ernte. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte von je 12 Pflanzen (9 Pflanzen bei den dekapitierten Pflanzen) an. Zur Ernte hatten die Pflanzen ein Alter von 19 d erreicht. 105
- Abbildung 33: Einfluss einer **Steigerung** des Nitratangebotes auf die L-Malatgehalte von Raps (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden mit 150 μM NO_3^- angezogen und im Laufe des Versuches auf eine Nährlösung mit 2 mM NO_3^- umgesetzt. Das Umsetzen der Pflanzen erfolgte 6 bis 48 h vor der Ernte, damit alle Pflanzen am gleichen Tag in der Mitte der Photoperiode geerntet werden konnten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte von je 12 Pflanzen (9 Pflanzen bei den dekapitierten Pflanzen) an. Am Tag der Ernte waren die Pflanzen 21 d alt. 107
- Abbildung 34: Einfluss von **Kalium** auf die L-Malatgehalte von Raps (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden über 14 Tage auf K^+ -freier Nährlösung angezogen und vor Versuchsbeginn auf eine Nährlösung mit 700 μM K^+ umgesetzt. Um alle Pflanzen im gleichen Alter ernten zu können, wurden die Versuchspflanzen 6 h bis 2 Tage vor der Ernte auf die K^+ -Nährlösung umgesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der L-Malatgehalte von 9 (dekapitierte Pflanzen) bzw. 12 Parallelen an. Die Ernte erfolgte 22 d nach der Saat in der Mitte der Photoperiode. 108
- Abbildung 35: **L-Malatgehalte** von *Brassica napus* L. bei dekapitierten Pflanzen, unter Kaliummangel und K^+ -ernährten Pflanzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der L-Malatgehalte von 9 (dekapitierte Pflanzen) bzw. 12 Parallelen an. 110

- Abbildung 36: Abnahme der L-Malat-Konzentration in Blatt, Spross und Wurzel von **Lupinen**, die auf K^+ -Mangel umgesetzt wurden. Die Gehalte von L-Malat wurden an 27 - 29 d alten Lupinen ermittelt, die mit $150 \mu M NO_3^-$ angezogen und in der Mitte der Photoperiode geerntet wurden. Von jeweils 9 - 12 Pflanzen (n) wurde der Mittelwert der L-Malatkonzentration berechnet und die Standardabweichung als Fehlerbalken in die Grafik eingetragen..... 111
- Abbildung 37: Schematische Darstellung zur Aufnahme und Transport von NO_3^- in der Wurzel. Über den apoplastischen Transport kann NO_3^- im Interzellularraum bis zum Casparyschen Streifen gelangen. Danach muss die Aufnahme in die Zellen der Pflanze erfolgen, bevor eine Weiterleitung in andere Teile der Pflanze möglich wird (symplastischer Transport). Bei hohem N-Angebot (oben) erfolgt die Aufnahme von NO_3^- nach dem *Low Affinity Transport System* (LATS), während bei niedrigem N-Angebot (unten) das Energie verbrauchende *High Affinity Transport System* (HATS) die N-Versorgung der Pflanze sicherstellt. 117
- Abbildung 38: Schema zur Regulierung des N-Stoffwechsels in der Zelle. Modifiziert nach **Crawford** (1995) und **Richter** (1988). NR=Nitratreduktase, NTP=Nitrattransportprotein, NiR=Nitritreduktase, Fd=Ferredoxin, GS=Glutaminsynthetase. 119
- Abbildung 39: Modell zur Regulation der NRA in höheren Pflanzen. Modifiziert nach **Kaiser** und **Huber** (1994^a und 1994^b), **Spill** und **Kaiser** (1994). In die Darstellung sind zusätzlich die Auswirkungen von K^+ oder Na^+ aufgenommen worden..... 125

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung (nach Wieneke , 1994) ...	18
Tabelle 2: Formel zur Berechnung der <i>relativen Wachstumsrate</i> (RGR) aus der Zunahme der Pflanzenmasse zwischen zwei Probenahmen (nach Siddiqi und Glass, 1987; He und Cramer 1993).	19
Tabelle 3: Reaktionsschritte bei der Reduktion von Nitrat zu Ammonium und dem Einbau des Stickstoffs in organische Verbindungen	22
Tabelle 4 : Reaktionsgleichungen zur Produktion von ^{13}N aus einem Wasser-Target und zum anschließenden Zerfall der entstandenen Isotope.	27
Tabelle 5: Reaktionsgleichungen bei der enzymatischen Bestimmung von L-Malat. Das Enzym Malatdehydrogenase (L-MDH) katalysiert die Umsetzung von L-Malat zu Oxalacetat (Gleichung 12). Durch Zusatz von L-Glutamat und dem Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) wird Oxalacetat aus dem Gleichgewicht aus Gleichung 12 entfernt und die Reaktion wird vollständig auf die rechte Seite verschoben. Am Photometer wird dann die gebildete Menge von $\text{NADH}+\text{H}^+$ bestimmt und daraus die ursprüngliche L-Malatkonzentration berechnet.	40
Tabelle 6: Berechnung der Malatkonzentration (c) einer Pflanzenprobe, anhand der photometrisch bestimmten Extinktionsdifferenz (ΔE).	41
Tabelle 7: Relative Wachstumsraten (RGR) von <i>Brassica napus</i> L. bei unterschiedlichen Anzuchtbedingungen. Die dunkel hervorgehobenen Wachstumsraten bzw. Wurzel/Spross-Verhältnisse zeigen einen signifikanten Unterschied (^a 0,1 %, ^b 1 %, ^c 5 % Niveau) zu den als Kontrolle geltenden Pflanzen der Anzucht mit 200 μM NO_3^- bei ausreichender Kaliumernährung.	43
Tabelle 8: Relative Wachstumsraten (RGR) von <i>Lupinus albus</i> L. unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die dunkel hervorgehobenen Wachstumsraten bzw. Wurzel/Spross-Verhältnisse zeigen einen signifikanten Unterschied (^a 1 %, ^b 5 % Niveau) zu den als Kontrolle geltenden Pflanzen der Anzucht mit 200 μM NO_3^- bei ausreichender Kaliumernährung.	46
Tabelle 9: Einfluss der Frischmasse der verschiedenen Pflanzenfraktionen auf die Bestimmung der Verteilung der NRA.	49
Tabelle 10: Anteil der Fraktionen an der Frischmasse und relative NRA-Werte von <i>Brassica napus</i> L. bei unterschiedlicher NO_3^- -Konzentration im Medium (s. Abbildung 9).	51
Tabelle 11: Induktion der NRA bei <i>Brassica napus</i> L. nach Umstellung von 100 μM NH_4^+ auf ein Medium mit 100 μM NO_3^- . Als Kontrolle dienten kontinuierlich mit NO_3^- angezogene Rapspflanzen.	52
Tabelle 12: Einfluss von Kalium in der Reaktionslösung des <i>in vivo</i> NRA-Tests auf die NRA (in $\mu\text{Mol Nitrat} / \text{FM h}^{-1}$) bei <i>Brassica napus</i> L. Die Anzucht erfolgte mit K^+ (A , B) oder bei 1 wöchigem K-Mangel (C , D) bei 250 μM NO_3^- . Alle Pflanzen waren zur Ernte im 4-Blatt Stadium. Die Ernte erfolgte in 2-stündigen Abstand am Versuchstag und die Ergebnisse wurden anschließend gemittelt. (Mittelwerte von 20 Pflanzen / Variante)	59

- Tabelle 13 :Einfluss von K^+ und Na^+ in der Reaktionslösung des *in vivo* NRA-Tests auf die NRA von *Lupinus albus* L. Die Anzucht erfolgte mit K^+ (**A, B**) oder bei 1 wöchigem K-Mangel (**C, D**) bei 250 μM NO_3^- . Alle Pflanzen waren zur Ernte 25 d alt. (Mittelwerte von 12 Pflanzen / Variante)..... 61
- Tabelle 14: Formeln zur Berechnung der Parameter K_M und V_{max} der Nitrataufnahme. Die Formeln basieren auf den Reaktionsgleichungen für eine Reaktion erster Ordnung, die von Michaelis-Menten (Gleichung 15) zur Charakterisierung der katalytischen Aktivität von Enzymen aufgestellt wurde. Bei der Anwendung dieser Gleichung auf Tunnelproteine oder Carrier wird hier mit den Parametern K_M die Affinität des Transportproteins zu seinem Substrat (NO_3^-) und mit V_{max} die maximale Aufnahmerate beschrieben (nach **Karlson**, 1984)..... 65
- Tabelle 15: Liste der berechneten Parameter der Nitrataufnahme von *Brassica napus* L., die nach verschiedenen Formeln (vgl. Tabelle 14) über eine *curve-fit* Routine berechnet wurden. Neben der Affinität der Transportproteine zu ihrem Substrat (K_M) und der maximalen Aufnahmerate (V_{max}) ist der Korrelationskoeffizient (r^2) zwischen Messwerten und den errechneten Ausgleichskurven angegeben. Die Daten im oberen Teil der Tabelle beziehen sich auf *Nitrat-induzierte* Pflanzen, während im unteren Teil die Werte *nicht-induzierter* Pflanzen dargestellt sind. 66
- Tabelle 16: Änderungen von K_M und v_{max} von Rapspflanzen, die nach NH_4 -Ernährung für 1 h einen Nitrat-Puls (100 μM) erhielten und dann für 1 h bis 24 h auf ein Medium ohne Stickstoff umgesetzt wurden..... 68
- Tabelle 17: Geradengleichungen zur Berechnung der Nitrataufnahme bei hohem Nitratangebot. In die untere Gleichung wurden die Parameter des Aufnahmesystems bei geringem Nitratangebot (Michaelis-Menten Kinetik) aufgenommen. 70
- Tabelle 18: Berechnung der Nitrataufnahme von *Brassica napus* bei hohem Nitratangebot. In der „kombinierten Gleichung“ erfolgte die Kurvenanpassung nach Gleichung 20 mit den Parametern des Aufnahmesystems bei geringem Angebot ($V_{max} = 23,89 \mu Mol / g FM h^{-1}$; $K_M = 44,39 \mu Mol Nitrat / l$). Mit r^2 sind die Korrelationskoeffizienten zwischen den Einzelmesswerte und der errechneten Geraden (Steigung = m, Achsenabschnitt = b) angegeben..... 71
- Tabelle 19: Nach den Formeln in Tabelle 14 berechnete Parameter der Nitrataufnahme von **Lupinus albus**. Die im oberen Teil der Tabelle dargestellten Daten stammen von Pflanzen mit NO_3^- als alleiniger N-Quelle, während die unteren Daten von Pflanzen mit NH_4^+ als N-Quelle stammen. 72
- Tabelle 20: Berechnung der Nitrataufnahme von **Lupinus albus** L. bei hohem Nitratangebot. Die Geradengleichungen aus Tabelle 17 wurden verwendet, um die Parameter m und b zu ermitteln. In die Berechnung der kombinierten Gleichung (Gleichung 20) gingen die Parameter des Aufnahmesystems bei geringem Angebot ($V_{max} = 3,73 Mol / g FM h^{-1}$ $K_M = 30,59 \mu Mol NO_3^- l^{-1}$) mit in die Berechnung ein..... 74
- Tabelle 21: Aufnahme und Verlagerung von $^{13}NO_3^-$ bei 15 min Markierung von 25 d alten Rapspflanzen (*Brassica napus* L.). Die Pflanzen wurden 10 d vor Versuchsbeginn auf ein Nährmedium ohne K^+ gesetzt. Während des Versuchs wurden die Pflanzen wieder auf Medium mit K^+ (700 μM) gesetzt. 80

- Tabelle 22: Einfluss der Kaliumernährung von *Brassica napus* L. auf die Gehalte von NO_3^- , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und in verschiedenen Pflanzenorganen. Alle Pflanzen waren zur Ernte im 4-Blatt Stadium und wurden zum selben Zeitpunkt geerntet. Wegen der unterschiedlichen Anzuchtbedingungen waren K-Mangelpflanzen 25 d, die auf Vollmedium angezogenen Pflanzen 22 d alt. 82
- Tabelle 23: Relative Gehalte von Nitrat und Kalium in verschiedenen Fraktionen von *Brassica napus* L. Als Referenz dienten die Gehalte der kontinuierlich mit 700 μM K^+ und 250 μM NO_3^- ernährten Variante, welche auf 100% gesetzt wurde. Weitere Details siehe Tabelle 22..... 83
- Tabelle 24: Kaliumaufnahme von *Brassica napus* L. nach 14 d auf unterschiedlichem K^+ -Angebot. Alle Versuchspflanzen wurden in der Mitte der Photoperiode aus ihrem Anzuchtmedium entnommen und für 1 h auf eine Aufnahmelösung umgesetzt, die 700 μM K^+ und 150 μM NO_3^- bzw. 150 μM NH_4^+ enthielt. Wegen der unterschiedlichen Wachstumsraten hatten die Pflanzen bei der Ernte ein unterschiedliches Alter, sie befanden sich aber alle im 2.Laubblattstadium. 84
- Tabelle 25: Einfluss der K^+ -Ernährung auf die Zusammensetzung des Xylemexudats von *Brassica napus* L.. Neben den Konzentrationen der wichtigsten Anionen bei gleich bleibender Ernährung (*steady state*) wurden auch die Veränderungen der Zusammensetzung des Xylemsaftes bei Umstellung der K-Ernährung untersucht. Die Pflanzen waren zur Ernte 21–24 d alt (2.Laubblattstadium). Für jeden Messwert wurde der Xylemsaft von 6–9 Rapspflanzen gesammelt und vereinigt. Für die Variante mit 250 μM NO_3^- liegen 4, für die andere Variante 2 Wiederholungen vor..... 89
- Tabelle 26: Einfluss der Kaliumernährung auf ausgewählte Anionen und Kationen im Xylemsaft von *Brassica napus* L. bei Anzucht mit 250 μM NO_3^- . Der Xylemsaft von je 6 - 9 Rapspflanzen (2.Laubblattstadium) unter gleichen Anzuchtbedingungen wurde vereinigt und mittels HPLC-Analytik bestimmt. Für jede Variante wurden 6 Wiederholungen durchgeführt..... 92
- Tabelle 27: Einfluss der K^+ Ernährung auf die Zusammensetzung des Xylemexudats von *Lupinus albus* L. Neben den Konzentrationen der wichtigsten Anionen bei gleich bleibender Ernährung (*steady state*) wurden auch die Veränderungen der Zusammensetzung des Xylemsaftes bei Umstellung der K-Ernährung untersucht. Die Pflanzen waren zur Ernte 26-29 d alt. Für jeden Messwert wurde der Xylemsaft von 4 - 6 Lupinen gesammelt und vereinigt. Für alle Varianten liegen 2 Wiederholungen vor..... 94
- Tabelle 28: Einfluss des NO_3^- -Angebots auf die Verlagerung von $^{14}\text{CO}_2$ in *Brassica napus* L. nach einer 1 h Markierung. Die Pflanzen wurden 48 h nach dem $^{14}\text{CO}_2$ -Puls geerntet und die Verteilung des aufgenommenen ^{14}CO bestimmt. Neben dem in den Pflanzen verbliebenen ^{14}C wurde auch die Abgabe in die Luft bzw. das Nährmedium gemessen..... 96
- Tabelle 29: Einfluss von K^+ auf die Verlagerung von ^{11}C in *Brassica napus* L. Die Versuchspflanzen waren mit 250 μM NO_3^- angezogen worden und befanden sich im 2-Blatt-Stadium. Als $\text{CPM}_{50\% \text{ max}}$ wird hier die Zeitspanne angegeben, die verstrichen ist, bis ein Detektor 50% des höchsten Messwertes erreicht hat..... 101

Danksagung

Herrn *Prof. Dr. F. Führ* danke ich herzlich für die Themenstellung der vorliegenden Arbeit, sowie für die Betreuung bei der Fertigstellung.

Herrn *Prof. Dr. A. Goldbach* danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn *Dr. J. Wieneke* danke ich für die Unterstützung bei den ^{13}N -Versuchen, sowie zahlreiche Diskussionen zum Hintergrund dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *U. Weller*, für die vielfältige Hilfe bei der Laborarbeit, sowie die Unterstützung bei An- und Aufzucht von Versuchspflanzen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Nuklearmedizin der Forschungszentrum Jülich GmbH danke ich für die Produktion der radioaktiven Isotope ^{13}N und ^{11}C .

Herrn *M. Dautzenberg* gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Versuchen mit ^{14}C und ^{11}C .

Für die Durchführung von HPLC-Messungen danke ich Herrn *S. Köppchen*.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.